

Aus der I. Medizinischen Universitätsklinik
Frankfurt am Main
(Direktor: Prof. Dr. F. Hoff)

Über den Nachweis von Antikörpern gegen Viridans-
Streptokokken und Streptokokken der Lancefield-Gruppen mit
den Methoden der indirekten Hämagglutination und Präzipi-
tation.

(Tierversuche)

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung der Doktorwürde
in der gesamten Medizin
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Johann-Wolfgang Goethe Universität
zu Frankfurt am Main

vorgelegt von

Roswitha Schiessl
Frankfurt am Main
im Januar 1955

Referent: Prof. Dr. W. H. Hauss

Coreferent: Prof. Dr. F. Hoff

Herrn Prof. Dr. W. H. Hauss spreche ich für die
Überlassung des Themas meinen besten Dank aus.

Aus der I. Medizinischen Universitätsklinik
(Frankfurt am Main)
(Direktor: Prof. Dr. F. Hoff)

Die vorliegende Arbeit berichtet über serologische Untersuchungen zum Nachweis von Antikörpern gegen Viridansstreptokokken und Streptokokken der Lancefield-Gruppen mit den Methoden der Präzipitation und der indirekten Hämagglutination in Tierversuchen.

Gliederung der Arbeit:

I.	Einleitung:	
1.	Serologische Untersuchungen bei akuten und chronischen Nephritiden und Polyarthritiden	S. 4
2.	Fragestellung für die vorliegende Untersuchung	S. 6
II.	Darstellung der hier angewandten Methoden zum Nachweis von Antikörpern gegen Viridans- und β -hämolytische Streptokokken	
1.	Herkunft und Eigenschaften der zur Immunisierung verwendeten Streptokokkenstämme	S. 8
2.	Gewinnung von Antisera durch Immunisierung von Kaninchen	S. 9
3.	Antigenherstellung nach dem Formamidverfahren nach Fuller. Eigene Technik.	S. 11
4.	Präzipitation	S. 15
5.	Indirekte Hämagglutination	S. 18
6.	Absorption	S. 21
III.	Ergebnisse:	S. 24
	Verlauf der Präzipitations-, Hämagglutinations- und Absorptionsversuche mit den Seren immunisierter Kaninchen an Hand von Titerkurven.	
IV.	Diskussion der Ergebnisse:	
1.	Spezifität der Hämagglutinationsmethode	S. 38
2.	Antigengemeinschaften der benutzten Stämme	S. 40
3.	Kreuzreaktionen	S. 49
V.	Zusammenfassung	S. 53
VI.	Literatur	S. 56

In den letzten Jahren haben die durch Streptokokken verursachten Erkrankungen ein besonderes klinisches Interesse gefunden. Dabei haben sich vor allem serologische Untersuchungen mit den auf Streptokokkeninfektionen folgenden Nachkrankheiten, d.h. mit der akuten Polyarthrititis und der akuten Nephritis befaßt. So gelang der serologische Nachweis einer vorangegangenen Infektion durch hämolytische Streptokokken bei etwa 80 bis 85 % der untersuchten akuten Polyarthritiden und Nephritiden. (1; 2;)

Diese klinischen Untersuchungen wurden dadurch ermöglicht, daß vorher bakteriologische Untersuchungen, vor allem die Arbeiten der Amerikanerin Frau Rebecca L a n c e f i e l d eine allgemein anerkannte und fast lückenlos brauchbare Einteilung der hämolytischen Streptokokken erbracht hatten. Die Identifizierung der β -hämolytischen Streptokokken wird nach den Methoden von Frau Lancefield und mehrerer Nachuntersucher durchgeführt (5, S. 194), wie es im folgenden kurz wiedergegeben werden soll :

Zunächst lassen sich die hämolytischen Streptokokken durch den Nachweis eines gruppenspezifischen Polysaccharids (= C-Substanz) mittels Präcipitation gegen Antisera immunisierter Kaninchen in bisher 12 serologische Gruppen, mit den Buchstaben A bis P bezeichnet, einteilen. (3). Innerhalb dieser Gruppen kann, ebenfalls durch Präcipitation gegen Kaninchenantisera bzw. durch Agglutination , eine von Gruppe zu Gruppe verschiedenen Anzahl von Typen unterschieden werden. Die Typendifferenzierung ermöglicht eine vollständige serologische Identitätsbestimmung eines β -hämolytischen Streptokokkenstammes. Darüber hinaus erlaubt die serologische Streptokokkendifferenzierung innerhalb gewisser Grenzen Rückschlüsse auf die Pathogenität eines Stammes. (13 c; 8)

Diese zur Identifizierung herangezogenen Gruppen- und Typenmerkmale sind an die Leibessubstanz der Bakterien gebunden. Außerdem besitzen die hämolytischen Streptokokken die Fähigkeit, substratspezifische, lösliche Fermente in ihre Umgebung abzusondern. Nach den Substraten, gegen welche die Fermente gerichtet sind, wird das fibrinlösende Ferment " Fibrinolysin ",

oder "Streptokinase", das hyaluronsäurelösende Ferment "Hyaluronidase" und das hämolysierende Ferment "Streptolysin" genannt.

Bei Erkrankungen durch hämolytische Streptokokken treten gegen diese Fermente im Patientenserum Antikörper auf. Diese Antikörper sind vor allem für die serologischen Untersuchungen bei der akuten Nephritis und Polyarthrit benützt worden, während die ebenfalls im Patientenserum auftretenden Antikörper gegen die gruppen- und typenspezifischen Leibes-substanzen aus methodischen Gründen weniger zu serologischen Untersuchungen herangezogen wurden.

Mit den genannten Antikörperreaktionen wurde die Bedeutung der hämolytischen Streptokokken beim Zustandekommen der akuten Polyarthrit und Nephritis wenigstens in ihrer Häufigkeit, jedoch nicht in den eigentlichen pathogenetischen Zusammenhängen geklärt (4; 5;).

Die Ergebnisse der Antikörperreaktionen gegen die Fermente und Leibes-substanzen hämolytischer Streptokokken stimmen überein mit der klinischen Erfahrung, die besagt, daß einer akuten Polyarthrit und Nephritis in den meisten Fällen eine Infektion mit hämolytischen Streptokokken vorangeht. Diese Reaktionen bieten jedoch keine Erklärungsmöglichkeit dafür, warum die akute Polyarthrit und die akute Nephritis dazu neigen, schubweise fortzuschreiten und chronisch zu werden. Der akute Schub einer chronisch gewordenen Polyarthrit oder Nephritis hängt nach den Ergebnissen der genannten drei Antikörperreaktionen anscheinend nur im kleineren Teil der Fälle mit einer Neuinfektion durch hämolytische Streptokokken ursächlich zusammen (2; S. 149).

In der Klinik werden für das Fortschreiten einer Polyarthrit oder Nephritis vielfach chronische Infektionen an den Zähnen und Tonsillen verantwortlich gemacht (6).

In chronisch entzündeten Tonsillen sind die hämolytischen Streptokokken neben den Viridansstreptokokken noch recht häufig. So fand K a l b a k (8) an der Oberfläche gekappter (tonsillotomierter) Mandeln in 41,7 % der Fälle hämolytische Streptokokken, in den Krypten ektomierter Tonsillen sogar in 63 % der Fälle. Sie gehörten fast ausnahmslos zur Gruppe der menschenpathogenen A-Streptokokken nach Lancefield (81 %).

(7; S. 394). Dagegen überwiegen in den Zahnherden bei weitem die Viridansstreptokokken (9). Da die Viridansstreptokokken die drei obengenannten Fermente nicht oder nur in sehr geringer Menge bilden, werden solche chronischen Zahn- und Tonsillenherde mit den genannten drei Antikörperreaktionen gegen hämolytische Streptokokken serologisch praktisch nicht nicht erfaßt (2; S.148). Somit kommen für einen serologischen Nachweis in erster Linie die Antikörper gegen die Leibessubstanzen der Viridansstreptokokken in Frage.

Bis jetzt ist eine für Reihenuntersuchungen brauchbare Antikörperreaktion gegen Viridansstreptokokken nicht vorhanden. Dies ist anscheinend darin begründet, daß auch bei sehr massiven Infektionen mit Viridansstreptokokken, wie bei der Endocarditis lenta, Antikörper nur in geringen Mengen frei im Patientenserum auftreten. (10). Die Antikörper gegen den homologen, die Endocarditis verursachenden Stamm von Viridansstreptokokken sind wohl vielfach nur in so geringen Konzentrationen vorhanden, daß es nicht zu einer Präcipitation des Patientenserums gegen den homologen Stamm kommt. Viel weniger ist demnach eine Präcipitation gegen den eigenen Stamm etwa aus einem Zahnherd bei einer Herdinfektion zu erwarten.

Da bei allen Infektionen durch Viridansstreptokokken wenn überhaupt dann nur mit sehr geringen Antikörperkonzentrationen zu rechnen ist, wurde in der vorliegenden Arbeit versucht, eine sehr empfindliche Antikörpernachweismethode bei der experimentellen Immunisierung von Kaninchen zum Nachweis von Antikörpern gegen Viridansstreptokokken heranzuziehen. Diese Methode ist das Verfahren der indirekten Hämagglutination.

Die Problemstellung für die vorliegenden Untersuchungen war demnach folgende:

1. Ergibt die Methode der indirekten Hämagglutination einen gesicherten Antikörpernachweis für Streptokokken oder sind die Hämagglutinationstiter zum Teil durch andere Serumbestandteile als Antikörper verursacht.
2. Zeigt die Hämagglutinationsmethode noch Antikörperkonzentrationen an, die von der meist gebräuchlichen Methode der Präzipitation nicht mehr erfaßt werden,

d.h. ist die Hämagglutinationsmethode bedeutend empfindlicher als die Präzipitation.

Diese Fragestellung läßt sich am besten in Tierexperimenten beantworten, weil hier in Immunisierungsversuchen die Antikörperbildung gegen serologisch genau bestimmte Stämme in einem genau begrenzbaren Zeitabschnitt nach bekannten Methoden untersucht werden kann.

II. DARSTELLUNG DER HIER ANGEWANDTEN METHODEN .

1. Streptokokkenstämme:

In der vorliegenden Untersuchung wurde bei insgesamt sieben Kaninchen die Antikörperbildung mit der Methode der indirekten Hämagglutination parallel mit der Präzipitation gegen sieben verschiedene Streptokokkenstämme verfolgt.

Zur Immunisierung unserer sieben Versuchstiere verwendeten wir 7 Streptokokkenstämme mit folgenden Bezeichnungen:

S 84? 831 D, 3I, 361Ia, 1II, 26 IIa, 17III.

S 84: Es handelte sich hierbei um einen β -hämolytischen Streptokokkenstamm aus der Gruppe A, Typ 3 (*Streptococcus pyogenes humanus*) der Lancefield'schen Klassifizierung (11, S. 571; 3;). Er gilt als guter Bildner des antigenen Streptokokkenfermentes O-Streptolysin und wurde uns von Herrn Dr. K a l b a k (Statens Serum Institut, Kopenhagen) überlassen.

831D: *Streptococcus faecalis*, ein Enterokokkenstamm aus der Gruppe D der Lancefield'schen Einteilung. Herr Professor S e e l e m a n n, Direktor des Instituts für Milchhygiene, Kiel, hat ihn uns zur Verfügung gestellt. (Enterokokken sind häufig anzutreffende Erreger abdomineller Infektionen sowie bakterieller Endocarditiden. Sie kommen in Zahnherden in bis zu 40 bis 50 % der Fälle vor (16; 9;).)

3I)
361Ia) Diese Stämme sind Vertreter der Viridansgruppen,
1II) die uns von Herrn Professor S e l b i e (London)
26IIa) überlassen worden waren.
17III)

S e l b i e hat in seiner Arbeit " Serological Classification of Viridansstreptococci from Subacute Bacterial Endocarditis, Teeth, and Throats " (12) eine serologische Differenzierungsmethode der Viridansstreptokokken veröffentlicht. Im Gegensatz zu Lancefield (13a; 13b;) und Solowey (14) und anderen Untersuchern, die ebenfalls an einer Klassifizierung der Viridansstreptokokken arbeiteten und unter Verwendung eines von L a n c e f i e l d (13a; S. 337) angegebene-

nen Extraktionsverfahrens zu sehr komplizierten Ergebnissen gelangten, verwendete S e l b i e zur Gewinnung des Antigens die F u l l e r 'sche Formamidmethode (15), die im Abschnitt " Herstellung von Antigen " dargestellt werden soll.

Auf die Differenzierung der Viridansstreptokokken nach Selbie wird im Abschnitt " Ergebnisse " eingegangen. -

2. A N T I S E R U M .

Das zum Antikörpernachweis verwendete Serum wurde aus dem Blut von Kaninchen gewonnen, die vorher mit Streptokokkenvakzinen immunisiert worden waren. Die Immunisierung erfolgte nach der von S e e l e m a n n angegebenen Methode, die er zur Herstellung gruppenspezifischer Sera nach Lancefield verwendete.

S e e l e m a n n schreibt wie folgt (16; S. 63) :
" Für ein Kaninchen genügt als Ausgangsmenge zum Zwecke einer 3-wöchentlichen Immunisierung , nach welcher Zeit gewöhnlich ein brauchbares gruppenspezifisches Serum erzielt wird, eine Ausgangskulturmenge von 200-250 ccm Traubenzuckerbouillon. Diese 18 Stunden alte Traubenzuckerbouillonkultur wird zentrifugiert; alsdann wäscht man den Streptokokkenbodensatz 2 mal mit physiologischer Kochsalzlösung und schwemmt das ganze in 50 ccm Formalin-Kochsalzlösung wieder auf (hergestellt mit 0,5 % des käuflichen Formalins). Nach 3-4 tägiger Aufbewahrung im Eisschrank sind die Streptokokken in der Regel abgetötet, sodaß die Aufschwemmung nunmehr für die Immunisierung verwendet werden kann. Wir gingen im allgemeinen so vor, daß die Kaninchen von der Aufschwemmung an 5 aufeinanderfolgenden Tagen der Woche (Montag bis Freitag) je 1 ccm i.v. erhielten; Sonnabend / Sonntag war Pause ; in der 2. und 3. Woche desgleichen. Insgesamt wurden also 15 ccm Vakzine benötigt. In anderen Fällen haben wir auch vergleichsweise mit steigenden Dosen, z.B. in der 1. Woche mit täglich je 2 ccm, in der 2. mit 3 ccm, in der 3. je 4 ccm gearbeitet. Trotz dieser erhöhten Vakzinierung , bei der also insge-

samt bis zu 55 ccm Vakzine eingespritzt wurden, haben wir nach diesen Verfahren keine besseren gruppenspezifischen Seren erzielt als nach dem vorgenannten Verfahren mit je 1 ccm. Gelingt das Serum nicht nach der 1. Injektionsserie, so können die Einspritzungen in derselben Weise auch noch 2 bis 3 Wochen lang wiederholt werden. Unter Umständen ist dann das Serum gut. "

Nach dieser Methode wurden unsere Impfstoffe hergestellt.

Um die Bouillonkultur auf ihre Reinheit zu prüfen, legten wir vor der Herstellung des Impfstoffes eine Kultur auf einer Kontrollblutplatte an und fertigten außerdem ein mikroskopisches Präparat an. Desgleichen wurde vor der ersten Verwendung des Impfstoffes nochmals eine Blutplatte mit der Aufschwemmung beimpft, um das Vorhandensein lebender Streptokokken in der Vakzine mit Sicherheit ausschließen zu können.

Eventuell überlebende Streptokokken bringen die Gefahr einer Infektion der Versuchstiere mit sich, die, besonders bei Verwendung von Viridansstreptokokken, zur Ausbildung einer Endocarditis lenta mit Todesfolge führen kann. (12; S.669)

In einem Fall (Enterokokkenstamm 831 D) zeigte sich nach der Formalinbehandlung noch Wachstum auf der Blutplatte. Wir erhitzten daraufhin dieselbe Aufschwemmung im Wasserbad 30 Minuten lang bei 56°C, was zur vollständigen Abtötung der Bakterien führte. Eine anschließend beimpfte Kontrollblutplatte zeigte keinerlei Wachstum.

Eine Erhöhung des Formalingehaltes können wir nicht empfehlen, weil dadurch die Ohrvenen und das anliegende Gewebe zu stark in Mitleidenschaft gezogen werden.

Die Impfstoffe wurden bei einer Temperatur von - 4°C im Kühlschrank aufbewahrt.

Ohne die Dosierung zu steigern, wurde an 5 aufeinanderfolgenden Tagen je ein ccm in die Ohrvenen der Kaninchen injiziert; anschließend erfolgte eine 2tägige Pause. Die Immunisierung erstreckte sich über einen Zeitraum von 4 Wochen, also über 4 Immunisierungsperioden.

Das Serum wurde jeweils nach der 2tägigen Pause entnommen, um einen direkten Einfluß des Impfstoffes zu vermeiden. Nach jeder Immunisierungsperiode wurden etwa 10 ccm Blut entnommen, nach der letzten nach Möglichkeit 20 bis 30 ccm.

Wir warteten die Retraktion des Blutkuchens ab, zentrifugierten das Serum ab und inaktivierten es 30 Min. lang bei 56°C im Wasserbad. Wurde das Serum nicht sofort aufgebraucht, so füllten wir es zu je 1 ccm in sterilisierte Wassermann-Röhrchen ab, die wir mit paraffinierten Zellstoffpfropfen verschlossen, und bewahrten es bei -21°C im Tiefkühler auf. Auf diese Weise blieb es längere Zeit haltbar.

Die im Antiserum enthaltenen Antikörper gegen die Leibes-substanzen der Streptokokken wurden unter Verwendung von flüssigem Antigen durch 2 Methoden nachgewiesen:

- a) P r ä c i p i t a t i o n ,
- b) i n d i r e k t e H ä m a g g l u t i n a t i o n .

3 . H E R S T E L L U N G V O N A N T I G E N :

Das flüssige Antigen, das bei der Präcipitation und Häm-agglutination Verwendung fand, wurde nach dem von Fuller beschriebenen Formamid- Verfahren hergestellt.

F u l l e r gibt folgende Methode an (15):

" 5 ccm einer 18 Stunden bebrüteten Traubenzuckerbouillonkultur werden zentrifugiert, der Überstand wird möglichst vollständig abgegossen. 100 cmm Formamid werden zum Bodensatz gegeben, das Glas wird geschüttelt und 15 Min. lang in ein Ölbad von 150°C gestellt. Man läßt das Röhrchen abkühlen, gibt 250 cmm Salzsäure-Alkohol dazu, mischt und zentrifugiert das Präcipitat ab. (Salzsäure-Alkohol: ein Gemisch von 95 Teilen absol. Alkohol und 5 Teilen 2n Salzsäure.)

Der Salzsäure-Alkohol schlägt Bakterienteilchen sowie teilweise ausgeflockte Proteine nieder, wohingegen er die gruppenspezifischen Antigene in Lösung hält. (Das gruppenspezifische Polysaccharid wird in dieser Arbeit der Einfachheit halber als " Antigen " bezeichnet. In Wirklichkeit ist es kein echtes Antigen, denn es löst nach Injektion keine Antikörperbildung aus.) Soweit jene Gruppen untersucht sind, deren typenspezifisches Antigen aus Polysaccharid besteht, wird dieses ebenfalls ausgefällt.

Der Überstand wird abpipettiert, in ein kleines Reagenz-

glas.gefüllt und mit 500 cmm Azeton versetzt. Man schüttelt das Röhrchen, zentrifugiert, und verwirft den Überstand.

Das Azetonpräzipitat ist mengenmäßig sehr gering, enthält aber praktisch das gesamte gruppenspezifische Antigen. 1 ccm Kochsalzlösung und 1 Tropfen Phenolrot (als Indikator) werden hinzugegeben und das ganze wird mit einer Spur Sodalösung neutralisiert. ...

Da das Antigen in fester Form isoliert wird, kann das Endvolumen nach Belieben variiert werden. Bei spärlichem Wachstum in der Bouillonkultur kann der Extrakt je nach Wunsch auf weitaus weniger als 1ccm verdünnt werden. Der Azetonüberstand enthält die einfacheren Eiweißbestandteile. Wenn man Azeton im Überschuß hinzufügt, werden große Mengen wertloser Substanz ausgefällt.

Man erhält einen reineren Extrakt, wenn man das Azeton-Präzipitat vor der Neutralisation mit Kochsalzlösung aufrührt. Ein Teil bleibt unlöslich und kann abzentrifugiert werden. Der Überstand wird anschließend neutralisiert und findet im Test Verwendung. Dieses Verfeinerungsverfahren kann dann wünschenswert werden, wenn die verwendeten Seren viele Antikörper gegen Nukleoproteine enthalten.

Die einfachste Extraktionsmethode ist folgende: man verdünnt die Formamid-Aufschwemmung der Bakterien mit Kochsalzlösung, neutralisiert, zentrifugiert den Rückstand ab und verwendet den Überstand. Der Extrakt ist jedoch nicht so gut wie der nach dem obigen Verfahren gewonnene.

Die Extraktionstemperatur ist nicht entscheidend; man kann nämlich auch gute Extrakte gewinnen, wenn man die Bakterien nur einige Minuten lang mit Formamid kocht. Jedoch sollte die Temperatur nicht unter 150°C liegen, da sich sonst die Bakterien nur sehr langsam auflösen."

(Übersetzt nach der Originalarbeit.)

Das Fuller-Verfahren wurde von S e e l e m a n n (16;S.57) wie folgt abgewandelt: der aus etwa 5,0 ccm Traubenzuckerbouillon durch Zentrifugieren gewonnene Streptokokkenbodensatz wird zusätzlich mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen, zen-

trifugiert und anschließend mit 0,15 ccm Formamid versetzt (Fuller: 0,1 ccm). Nach dem Ölbad werden 0,075 ccm Salzsäure- Alkohol in die Formamid- Aufschwemmung gegeben (Fuller: 0,25 ccm). Der Polysaccharid - Niederschlag wird in 0,5 ccm Kochsalzlösung suspendiert. (Fuller: 1,0 ccm oder beliebig.) Die Wasserstoffionenkonzentration wird mittels Indikatorpapier eingestellt.

Bei unseren eigenen Arbeiten gingen wir im wesentlichen nach S e e l e m a n n vor:

1 Liter 1%ige Traubenzuckerbouillon wird mit 10 ccm einer 18 Stunden bebrüteten Vorkultur beimpft und für 18 Stunden im Brutschrank bei 37°C belassen. Gutes Wachstum ist bereits makroskopisch an der Trübung der Flüssigkeit erkenntlich. Zur Kontrolle auf Reinheit des Stammes wird eine Kultur auf einer Blutplatte angesetzt sowie ein mikroskopisches Präparat angefertigt.

Die Bouillon wird 15 Minuten bei 2500 Umdr. / Min. zentrifugiert, der Überstand möglichst vorsichtig abgeschüttet und der Bodensatz in physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt, erneut zentrifugiert und der Bodensatz wiederum mit Kochsalzlösung aufgeführt. Dabei wird die gesamte Menge auf 4 Zentrifugengläser zu gleichen Teilen verteilt, abermals gewaschen und dekantiert. Nunmehr wird der Streptokokkenbodensatz in jedem Glas mit 7,5 ccm Formamid (insgesamt also 30 ccm) aufgeführt. Die Röhrchen werden mit Gummistopfen verschlossen und 15 Minuten lang bei 150 - 160°C im Ölbad gekocht. Nach dem Abkühlen werden in jedes Glas 3,75 ccm (insgesamt 15 ccm) Salzsäure - Alkohol pipettiert und erneut 15 Minuten bei 2500 Umdrehungen zentrifugiert. Der Überstand aus den 4 Zentrifugengläsern wird in saubere Gläser abgegossen und mit je 25 ccm Azeton (insgesamt 100 ccm) versetzt.

(Der durch Salzsäure - Alkohol ausgefällte Bodensatz, der in der Hauptsache Bakterienteilchen und makromolekulare Proteine enthält (15), wurde in insgesamt 200cm Kochsalzlösung aufgeschwemmt und bei -21° im Tiefkühler

aufbewahrt. - Wir haben diese Suspensionen noch auf ihren Gehalt an eiweißartigen antigenen Substanzen überprüft; mit unseren Untersuchungsmethoden (- Hämagglutination und Präzipitation -) konnten wir solche jedoch nicht nachweisen.)

Die Azetonlösung muß einige Minuten stehenbleiben bis sich deutliche Flocken bilden. Unterbleibt diese Ausflockung, so muß Azeton im Überschuß zugesetzt werden. Nach viertelstündlichem Zentrifugieren wird das Sediment in einer Gesamtmenge von 50 ccm Kochsalzlösung (pro Röhrchen 12,5 ccm) gelöst. Im Schüttelkolben wird diese als " R o h a n t i g e n " bezeichnete Suspension so lange mit Glasperlen geschüttelt, bis keine groben Bestandteile mehr sichtbar sind.

Mit 0,5%iger Sodalösung (und gegebenenfalls n/10 HCl) wird das " Rohantigen " auf pH 7,2 eingestellt und mit pH - Meter " P e h a v i " (Fa. Hartmann & Braun, Ffm) nachgemessen. (Kontrollpuffer laut Anweisung = Standard-Azetat - Lösung pH 4,62, Tp. 18°C .)

Wassermann- Röhrchen werden mit Zellstoffpfropfen fest gestopft und bei 180°C 90 Minuten lang sterilisiert. Wir füllten darin das Rohantigen zu 1 ccm ab und bewahrten es bis zur Verwendung bei -21°C auf. Unter diesen Bedingungen ist es einige Monate haltbar.

Es empfiehlt sich jedoch nicht, einmal aufgetautes Antigen wieder einzufrieren, da dann mit einem Abnehmen der antigenen Eigenschaften gerechnet werden muß.

Wir gingen damit im wesentlichen nach der Seelemann'schen Methode der Antigenherstellung vor; unser Polysaccharid- Antigen wurde in der Hälfte der von Seelemann angegebenen Menge Kochsalz gelöst und statt neutraler Reaktion wählten wir pH 7,2.

Vor Verwendung wurde das Rohantigen abzentrifugiert und das Sediment verworfen. Für die Präzipitation und Absorption benutzten wir das Antigen unverdünnt, für die Hämagglutination 1:2 mit Puffer verdünnt.-

Wie bereits erwähnt, handelt es sich bei den von uns als " Rohantigen " bzw. " Antigen " bezeichneten Streptokokkenextrakten um keine echten Antigene, sondern um H a p t e n e, da sie, der Definition des Haptens entsprechend, wohl spezifisch mit Antikörpern reagieren, jedoch ϕ im Serum bei parenteraler Zufuhr keine Antikörperbildung auslösen können (5a).

3. P R Ä C I P I T A T I O N :

Die Präzipitation wurde zum ersten Male von der Amerikanerin Frau Rebecca L a n c e f i e l d zur Differenzierung antigenetisch wirksamer Streptokokkensubstanzen angewendet (13a und 13b).

Zur Ermittlung der Gruppenzugehörigkeit β -hämolytischer Streptokokken arbeitete sie folgende Methode aus:
" Bei der Durchführung dieser Reaktion wurden steigende Mengen von Extrakten (= Streptokokkenextrakte = " Antigen ") in eine Reihe von Reagenzröhrchen pipettiert; gewöhnlich stellten 0,4 , 0,1 und 0,025 ccm eine Reihe dar. Diese Mengen wurden mit gewöhnlicher Kochsalzlösung auf 0,4 ccm ergänzt und ein Kontrollröhrchen mit 0,4 ccm Kochsalz-Lösung angefügt. Darüber wurden jeweils in jedes Röhrchen 0,2 ccm unverdünntes Antiserum geschichtet und 10 bis 30 Minuten bei Zimmertemperatur oder im Wasserbad bei 37°C gelassen, um die Ringbildung abzuwarten. Dann wurden die Röhrchen geschüttelt und 2 Stunden bei 37°C ins Wasserbad gestellt. Die endgültige Kontrollablesung fand statt, nachdem die Röhrchen über Nacht im Kühlschrank gestanden hatten." (11) (Übers. nach der Orig.-Arbeit d. Verf.)

Im Jahre 1938 beschrieb sie eine Mikro-Präzipitationsmethode in Spezialröhrchen. Die Lancefield'schen

Mikro-Präcipitations-Röhrchen haben einen Durchmesser von 7 mm und sind an ihrem unteren Ende konisch ausgezogen. Zuerst wird das Antigen in das Röhrchen pipettiert. Darüber wird das Antiserum, konzentriert oder verdünnt, geschichtet. An der Berührungsfläche bildet sich ein Ringpräcipitat aus (17).

Dieses Verfahren hat den Vorzug, bei geringem Verbrauch an flüssigem Antigen einen sehr präzisen Antikörpernachweis zu erbringen.

Bei unseren eigenen Arbeiten gingen wir von der Lancefield'schen Mikromethode aus.

Puffer: Zur Bestimmung der Antikörperkonzentration im Serum ist es nötig, von den zu prüfenden Seren Verdünnungsreihen herzustellen. Zur Verdünnung wurde gepufferte physiologische Kochsalzlösung verwendet, bestehend aus 4 Teilen steriler Kochsalzlösung und einem Teil Phosphatpuffer pH 7,2.

Die Stammlösungen für den Phosphatpuffer wurden nach S ö r e n s e n (18) allwöchentlich neu hergestellt und bei + 4°C im Kühlschrank aufbewahrt.

72 ccm 1/15 m Natriumphosphat ($1/15 \text{ m Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$ = 11,876 gr auf 1 Liter Aqua bidest.) plus 28 ccm 1/15 m Kaliumbiphosphat ($1/15 \text{ m KH}_2\text{PO}_4$ = 9,078 gr auf 1 Liter Aqua bidest.) ergaben mit 400 ccm steriler physiologischer Kochsalzlösung insgesamt 0,5 l gepufferte Kochsalzlösung, im folgenden kurz " Puffer " genannt. Die Einstellung auf pH 7,2 erfolgte mit pH-Meter " Behavi ". Zum sicheren Ausschluß von Bakterienwachstum, das die Wasserstoffionenkonzentration beeinträchtigt, wurde der Puffer täglich frisch hergestellt.

Bei all unseren Arbeiten stellten wir das Milieu auf pH 7,2 ein, das sich für unsere Reaktionen als optimal erwiesen hat, da bei diesem pH die Kontrollen am eindeutigsten negativ waren.

Serumverdünnungen: In einem Röhrchen werden 1 ccm inaktiviertes Serum (30 Minuten bei 56°C) und 1 ccm Puffer

vermischt (Verd.1:2),davan 1 ccm entnommen,in ein sauberes Glas gegeben und wiederum mit 1 ccm Puffer vermischt (Verd. 1 : 4).Die Reihe wird in derselben Weise fortgesetzt,sodaß Verdünnungen von 1:8, 16, 32, 64 in geometrischer Reihe resultieren.

Die Präcipitationen führten wir in eigens angefertigten Röhrchen durch; unsere Präcipitationsröhrchen waren etwa 4 cm lang mit einem Lumen von 4 mm und einem leicht nach außen gebogenen Rand.

Wir pipettierten nun in das erste Röhrchen ungefähr 0,15 bis 0,2 ccm konzentriertes Serum,in die folgenden Röhrchen der Reihe nach die gleiche Menge der verdünnten Sera.

Das aufgetaute Rohantigen wird abzentrifugiert,der Überstand mit der Pipette aufgenommen und sehr behutsam auf das Serum überschichtet.Dabei geht man am besten so vor,daß man zunächst nur einen kleinen Tropfen am Rande des Röhrchens auf das Serum herablaufen läßt und dann ganz langsam tropfenweise etwa 0,15 bis 0,2 ccm Antigen ebenfalls an der Wand herunterlaufen läßt.Diese Sorgfalt beim Überschichten ist unbedingt erforderlich,da besonders bei höheren Verdünnungsstufen (infolge der geringeren Oberflächenspannung des verdünnten Serums) die beiden Flüssigkeiten ineinander fließen und keine Trennungsebene bilden.

Das überschichtete Serum bleibt 20 Minuten lang bei 37°C im Brutschrank.Die erste Ablesung erfolgt sofort; die Kontrollablesung wird nach weiteren 10 Minuten (Zimmertemperatur) vorgenommen.

Während der Inkubation im Brutschrank hat sich bei genügend hohem Gehalt an Antikörpern an der Trennungslinie der Schichten ein weißes Präcipitat ausgebildet , das bei Betrachtung gegen einen dunklen Hintergrund besonders deutlich in Erscheinung tritt.Je nach der Stärke des Präcipitats beurteilten wir die Schicht als " + + " bei einer Schichtdicke von etwa 0,5 mm und mehr,als " + " die Schichtdicke von weniger als 0,5 mm.Nicht ganz si-

cher zu beurteilende Präcipitate erhielten den Wert " I " .

Wir legten die Serumverdünnungen im allgemeinen erst dann an, wenn das konzentrierte Serum stark positiv reagierte oder wenn ein erhöhter Titer zu erwarten stand.

5.INDIREKTE HÄMAGGLUTINATION:

Ein weiteres Verfahren zur Ermittlung von Antikörpertitern im Serum ist die Hämagglutination. Sie bedient sich zur Darstellung der Antigen- Antikörper - Reaktion der Agglutination von Erythrozyten, an deren Oberfläche vorher Antigen angelagert worden ist. (Zusammenfassende Angaben über " Hä magglutination " bei 19.) .

L a n d s t e i n e r (20) hat als erster das Auftreten einer spezifischen Hämagglutination beobachtet, als er antigene Substanzen an Erythrozyten adsorbierte und diese mit Antiserum zusammenbrachte. M i d d l e - b r o o k und D u b o s (21) bauten diese Reaktion aus zum Antikörpernachweis bei Tuberkulose. Wir verwendeten das Prinzip dieser letzteren Methode und gingen im einzelnen so vor :

I. Material: Benötigt werden etwa 1 ccm inaktiviertes Serum (30 Minuten bei 56°), 2 ccm Citratblut desselben Tieres, von dem das Serum entnommen wurde (Blutgruppenunterschiede !), ferner pro Reihe 1 ccm Antigen sowie etwa 250 ccm frische Pufferlösung pH 7,2 (Herstellung siehe unter " Präcipitation ").

II. Sensibilisierung der Erythrozyten: Das Citratblut (0,4 ccm Sol.Natr.citr.(3,8 %ig) + 1,6 ccm Blut) wird mit Puffer dreimal gewaschen (3 Minuten bei 1500 Umdr./Min. zentrifugieren) und der Überstand jedes Mal dekantiert. In eine Lösung, bestehend aus

1 ccm Antigen + 1 ccm Puffer, werden 0,01 ccm gewaschene, gepackte Erythrozyten pipettiert. Die Aufschwemmung wird gut aufgeschüttelt und für 2 Stunden in den Brutschrank bei 37°C gestellt. Während dieser Inkubationszeit wird die Suspension alle 15 Minuten geschüttelt, um eine möglichst große Kontaktfläche zwischen Blutkörperchen und flüssigem Antigen herzustellen. Unter diesen Gegebenheiten reichern sich antigene Substanzen an der Oberfläche der Erythrozyten an. Die mit Antigen besetzten Erythrozyten werden als "sensibilisierte Erythrozyten" bezeichnet.

Nach der zweistündigen Inkubation werden die Blutkörperchen wieder mit Puffer 3 mal je 3 Minuten bei 1500 Umdr./Min. gewaschen. Der letzte Überstand wird abgesaugt und der Erythrozyten - Niederschlag in 5,0 ccm Puffer suspendiert, sodaß eine 0,2 %ige Aufschwemmung sensibilisierter Erythrozyten resultiert.

III. Serumverdünnungsreihe : In alle Röhrchen einer Reihe, ausgenommen das erste, werden 0,25 ccm Puffer pipettiert. In das 1. und 2. Röhrchen kommen nun je nach der gewünschten Anfangsverdünnung je 0,25 ccm verdünntes oder unverdünntes Serum. Der Inhalt des 2. Röhrchens wird durch Schütteln vermischt, 0,25 ccm werden entnommen und in das nächste Röhrchen gegeben, vermischt, wiederum 0,25 ccm entnommen usw. Aus dem letzten Röhrchen werden 0,25 ccm verworfen. (Wir stellten im allgemeinen Verdünnungen bis 1 : 1024 her und setzten die Reihe nur dann fort, wenn höhere Titer zu erwarten standen.)

Die Aufschwemmung sensibilisierter Erythrozyten wird nun zu je 0,25 ccm pro Röhrchen in die Reihe der verdünnten Sera einpipettiert. - Es ist zu beachten, daß dadurch die Verdünnung verdoppelt wird; hat man also im ersten Röhrchen 0,25 ccm konzentriertes Serum, so resultiert nach Zusatz der Erythrozyten - Suspension eine Serumverdünnung 1 : 2:

IV. Antigenkontrolle: Am Ende einer jeden Reihe wird ein Röhrchen mit 0,25 ccm Puffer und 0,25 ccm der Aufschwemmung sensibilisierter Blutkörperchen angesetzt. Diese Kontrolle soll zeigen, ob die sensibilisierten Erythrozyten etwa spontan, d.h. ohne Zusatz von Serum agglutinieren. Ist die Kontrolle positiv, so ist die Versuchsreihe nicht zu beurteilen, da dann auch schon ohne die Mitwirkung von Antikörpern eine Hämagglutination eintreten würde.

V. Serumkontrolle: Für jedes Serum ist eine Serumkontrolle anzufügen. 0,25 ccm unverdünntes, inaktiviertes Serum wird mit derselben Menge einer Aufschwemmung versetzt, die aus 0,01 ccm gewaschenen, gepackten, unsensibilisierten Erythrozyten auf 5,0 ccm Puffer (0,2 - prozentige Aufschwemmung) hergestellt worden ist.

Die Serumkontrolle muß ebenfalls negativ sein, denn sie entspricht in ihrer Zusammensetzung in etwa den physiologischen Verhältnissen im Blute. -

VI. Ablesung: Das Gestell mit den Verdünnungsreihen wird für 2 Stunden in den Brutschrank (37°C) gestellt, anschließend wird es über Nacht im Kühlschrank (+ 4°C) gelassen und am nächsten Morgen abgelesen. Eine erste Ablesung kann jedoch schon kurz nach der Entnahme aus dem Brutschrank erfolgen, nachdem die Flüssigkeit in den Röhrchen aufgeschüttelt worden ist.

Je nach der Teilchengröße des agglutinierten Erythrozytensedimentes wählten wir die Bezeichnungen " + + + " für Teilchen über 1 mm Durchmesser, " + + " von 0,5 bis 1 mm, und " + " für weniger als 0,5 mm. Nicht eindeutig positive Niederschläge erhielten die Wertigkeit " () ".

Bei fortgeschrittener Immunisierung der Tiere wurden die Erythrozyten leicht hämolytisch, besonders, wenn sie mit den zur Immunisierung benutzten, das heißt homologen Antigen sensibilisiert worden waren. Anscheinend führt dann der hohe Antikörpergehalt des Serums nicht nur

zur Erythrozyten - Agglutination, sondern auch zur Hämolyse, selbst wenn das Serum inaktiviert, d.h. das Komplement zerstört ist.

6. ABSORPTION :

Zum Nachweis der Spezifität der Antikörper wurden Absorptionsversuche mit flüssigem Antigen und lebenden Streptokokken durchgeführt. Das Prinzip der Absorption (13a; 16;) besteht darin, daß man im Serum die Antikörper im Antigen - Antikörper - Komplex zu binden und damit in ihrer spezifischen Wirkung zu hemmen versucht.

Man unterscheidet zwischen homologer und heterologer Absorption. Bei der ersteren wird dem Serum das homologe, das ist das aus dem Immunisierungsstamm gewonnene Antigen, zugesetzt. Es kommt zu einer Bindung der im Serum enthaltenen Antikörper. Bei anschließender Präcipitation und Hämagglutination mit dem absorbierten Serum ist mit einer Verminderung der Antikörperkonzentration zu rechnen.

Die heterologe Absorption wird mit dem Antigen aus einem fremden, nicht zur Immunisierung verwendeten Stamm durchgeführt. (Siehe hierzu auch Abschnitt IV. " Antigengemeinschaften der benutzten Stämme ".) Bei der Präcipitation und Hämagglutination mit dem heterolog absorbierten Serum ist mit keiner Verringerung der Antikörperkonzentration zu rechnen; die Titer sollen unverändert bleiben.

Frau L A N G E F I e l d beschreibt ihre Absorptionstechnik wie folgt (13a; 13b;): eine 18 Stunden bebrütete Streptokokkenkultur wird 30 Minuten lang im Wasserbad bei 56°C erhitzt, was zur Abtötung der Streptokokken führt. Danach wird die Kultur absentrifugiert, der Bodensatz in Kochsalzlösung aufgeschwemmt. Inakti-

viertes Serum wird mit der gleichen Menge hitzeabgetöteter, suspensierter Streptokokken versetzt und 30 Minuten lang bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Das Serum wird dann abzentrifugiert und zur Präcipitation verwendet.

Wir gingen bei anderen Versuchen folgendermaßen vor :

A. Absorption mit flüssigem Antigen: 1 Teil Serum und 1 Teil Rohantigen werden vermischt und für eine Stunde in den Brutschrank gestellt und während dieser Zeit viertelstündlich aufgeschüttelt. Die Lösung wird abzentrifugiert, der Überstand abpipettiert und abgemessen. Dieses verdünnte Serum (1 : 2) wird mit derselben Menge Antigen versetzt, sodaß nunmehr eine Serumverdünnung 1 : 4 resultiert. Nach einstündiger Inkubation im Brutschrank und abermaligem Abzentrifugieren wird nochmals Antigen zugesetzt, sodaß nach dreimaliger Absorption eine Endverdünnung von 1 : 8 resultiert. Dieses dreifach verdünnte Serum wird nur zur Hämagglutination verwendet. Bei der Absorption für die Präcipitation wird nur einmal Antigen zugegeben und nach 2 - stündiger Inkubation mit einer Verdünnung 1 : 2 gearbeitet.

B. Absorption mit lebenden Streptokokken: Für die Absorption kann anstelle von flüssigem Antigen auch eine Aufschwemmung lebender Streptokokken verwendet werden: durch Zentrifugierung erhält man aus 200 bis 250 ccm einer 18 Stunden bebrüteten Traubenzuckerbouillon - Kultur einen Bodensatz, der dreimal mit Puffer pH 7,2 gewaschen wird. Zuletzt werden die Streptokokken in insgesamt 10 ccm Puffer aufgeschwemmt. Diese Suspension findet anstelle des flüssigen Antigens Verwendung.

Eine Absorption mit Antigen, das zur Vergrößerung der wirksamen Oberfläche vorher an Erythrozyten angereichert worden war, sowie Absprengungsversuche, bei

denen eine " Sprengung " des Antigen - Antikörper - Komplexes erreicht werden soll (Dissoziation bei 30 Minuten Wasserbad von 56°C), führten bei unseren Versuchen zu keinem Erfolg, da vorzeitige Hämolyse eintrat.

III. E R G E B N I S S E.

Bei der Beurteilung unserer Ergebnisse gingen wir von der S e l b i e ' schen Einteilung der Viridansstreptokokken aus (12). Im besonderen verweisen wir auf die vorliegende Veröffentlichung von S e l b i e ; wir möchten aber zur Erläuterung unserer eigenen Ergebnisse im folgenden einen kurzen Abriß aus seiner Arbeit wiedergeben und uns dabei auf die für uns wichtigen Stellen beschränken.

Von insgesamt 209 Viridansstämmen, die bei bakteriellen Endocarditiden sowie aus Zahn - und Rachenherden isoliert worden waren, sind Antigenextrakte nach Fuller (s.O.) hergestellt worden. Acht verschiedene Stämme wurden zur Immunisierung von Versuchstieren (Kaninchen) verwendet, und mit den so gewonnenen Antiseren wurden Präcipitationen mit den Extrakten aus allen 209 Stämmen durchgeführt. Dabei wurden spezifische Präcipitationen beobachtet, insofern als die Antigene jeweils nur mit einigen Antiseren reagierten. (Siehe die nach Selbie übersetzte Tabelle.) Auf Grund der Tatsache, daß die Präcipitationen bei einigen Seren eintraten, bei anderen aber ausblieben, und durch Vergleich der Reaktionsformen untereinander, konnte Selbie 3 Hauptgruppen voneinander abgrenzen, die er mit den Ziffern I, II und III bezeichnete.

Seine Ergebnisse zeigten , daß Gruppe I nie mit der Gruppe II reagierte; das heißt, Antigen aus der Gruppe I mit Antiserum gegen Gruppe II wie auch umgekehrt Antigen aus Gruppe II mit Antiserum gegen Gruppe I ergaben keinerlei Präcipitation. Ähnlich war das Verhalten der Gruppe III, die vorwiegend nur mit homologen Antiserum präcipitierte. In dieser Gruppe gab es jedoch vereinzelte Ausnahmen, bei denen Reaktionen besonders mit Stämmen der I. , seltener mit Vertretern der II. Gruppe auftraten.

Einteilung der Streptokokken (nach Selbie)

aus *Endocarditis*, *Leitg.*, *Zahn- und Racheninfekten* sowie anderen Quellen durch *Präzipitationsreaktionen* mit *Antiseren*:

Serolog. Gruppe	Anzahl der Stämme	Reaktionen mit Antiseren									
		Serum No 5	Serum No 30	Serum No 8	Serum No 3	Serum No 16	Serum No 2	Serum No 1	Serum No 10		
I	6	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—
	32 { 12	+	+	10	1	—	—	—	—	—	—
	14	+	—	6	2	—	—	—	—	—	—
Ia	17	+	+	+	+	—	—	2	5	13	13
	41 { 15	+	+	2	5	—	—	1	5	13	13
	9	+	—	+	4	—	—	1	4	7	7
II	20	—	—	—	—	+	+	+	+	—	—
	28 { 2	—	—	—	—	+	+	1	—	—	—
	6	—	—	—	—	1	3	+	—	—	—
IIa	29	15	7	4	1	+	+	+	+	21	21
	55 { 15	11	10	4	1	+	7	—	—	3	3
	11	8	3	3	1	4	6	+	+	4	4
III	13	6	—	—	—	—	—	—	—	+	+
	25 { 5	—	+	—	1	—	—	1	+	+	+
	7	—	+	—	—	—	—	—	—	+	+

Die Streptokokken werden in 5 Gruppen eingeteilt, deren jede wiederum 3 Serien von Stämmen enthält; bei jeder von ihnen werden die Reaktionen mit den entsprechenden Antiseren folgendermaßen bezeichnet:

+ = alle Stämme positiv; — = alle Stämme negativ; Ziffern = Anzahl der positiven Stämme.

Diese letztere Beobachtung gewinnt auch bei unseren Versuchen eine gewisse Bedeutung.

Außer den Gruppen I, II und III, die im wesentlichen nur mit homologen, das heißt in diesem Falle gruppengleichen Seren präcipitieren, fand Selbie die Gruppen Ia und IIa, deren Verhalten nicht in demselben Maße spezifisch war. So reagierte das Antigen aus Gruppe Ia zwar vorwiegend mit Antiserum I (d.h. mit den Sera der gegen die I - Stämme immunisierten Tiere) ; es wurden aber auch Präcipitationen mit Antiseren gegen die Gruppen II und III festgestellt. In ähnlicher Weise präcipitierten Antigene aus IIa zwar vorwiegend mit den Antiseren gegen II ; es traten aber auch Präcipitationen mit den Antiseren I und III auf.

Diese Einteilung der Viridansstreptokokken in 5 Gruppen - 3 Hauptgruppen und 2 Untergruppen - hat Selbie, wie aus der Tabelle ersichtlich ist, aus den Präcipitationsbefunden der aus 209 Stämmen gewonnenen Fuller-Extrakte mit insgesamt acht Antiseren abgeleitet.

Nach dem Verhalten eines Stammes gegenüber diesen acht Seren ist lediglich eine Bestimmung des überwiegenden Anteils seiner Antigenstruktur möglich, d.h. eine Zuteilung in eine der 5 Gruppen, nicht jedoch eine vollständige Bestimmung aller Antigene dieses Stammes. Eine Typendifferenzierung läßt sich aus dem Verhalten gegen die acht Selbie ' schen Antisera nicht ableiten, d.h. ein einzelner Stamm kann nicht in seiner Identität bestimmt werden (5; S. 197).

Durch diese Präcipitationstests, die auch mit anderen, biochemischen Differenzierungsmethoden verglichen worden waren, gelang es Selbie, fast alle seiner 209 Viridansstämme zu klassifizieren.

- - -

Bei den hier benutzten Viridansstämmen bedeutet die römische Ziffer (I, Ia , II, IIa, III) die Gruppenzu-

gehörigkeit der Stämme nach der Selbie ' schen Klassifizierung und die arabische Ziffer lediglich die laufende Stammnummer.

(Die arabische Ziffer wurde in den Tabellen nicht aufgeführt.)

Die Ergebnisse der Hämagglutinations - und Präzipitationsbefunde seien im folgenden zunächst getrennt für jeden der sieben Stämme an Hand von Titerkurven besprochen. Bei jedem Tier wurden zuerst mit allen sieben Stämmen vor Beginn der Immunisierung sowohl in der Hämagglutination als auch in der Präzipitation 3 als Normaltiter angesehene Ausgangswerte bestimmt. Die drei Präzipitationen vor Immunisierungsbeginn waren bei allen Tieren mit allen Antigenen negativ; d.h. mit der Präzipitationsmethode waren Streptokokkenantikörper bei den Tieren nicht nachzuweisen. Dagegen fanden sich bei allen Tieren gegen alle sieben Antigene vor der Immunisierung Hämagglutinationstiter unterschiedlicher Höhe, die jedoch für ein und dasselbe Antigen relativ konstant um einen Wert bei den drei Bestimmungen lagen. Diese sogenannten " Normaltiter " sind ebenfalls auf den Kurven eingetragen.-

Die angegebenen Werte in den Titerkurven beziehen sich sowohl für die Hämagglutination als auch für die Präzipitation auf " + ", d.h. einfach positive Reaktion.

Bei den Abbildungen der Titerabläufe, die bei den einzelnen Tieren gegen die sieben Antigene beobachtet wurden, ist die Kurve des jeweils zur Immunisierung benutzten, d.h. homologen Stammes schwarz umrandet hervorgehoben. Die senkrechten Pfeile bezeichnen den Zeitpunkt des Immunisierungsbeginns.

Die in der mittleren Spalte angegebenen Serumverdünnungen gelten für die Abbildungen zu beiden Seiten, sowohl für die Hämagglutination als auch für die Präzipitation. Die am Ende der Titerkurven eingezeichneten Säulengruppen sollen das Resultat der Absorptions-

versuche mit dem jeweils homologen und heterologen Antigen darstellen, und zwar gilt die erste, links stehende Säulengruppe für die Hämagglutination und die zweite Säulengruppe für die Präcipitation .-

Die Kennzeichnung des homologen bzw. heterologen Antigens ist in der Legende jeder Abbildung wiedergegeben.

TIER A

I

Normal 1. Woche 2. Woche 3. Woche 4. Woche

II

Normal 1. Wo. 2. Wo. 3. Wo. 4. Wo.

III

Normal 1. Wo. 2. Wo. 3. Wo. 4. Wo.

A

Normal 1. Wo. 2. Wo. 3. Wo. 4. Wo.

100%

512

256

128

64

32

16

8

4

2

1

64

32

16

8

4

2

1

256

128

64

32

16

8

4

2

1

64

32

16

8

4

2

1

64

32

16

8

4

2

1

64

32

16

8

4

2

1

64

32

16

8

4

2

1

64

32

16

8

4

2

1

64

32

16

8

4

2

1

64

32

16

8

4

2

1

64

32

16

8

4

2

1

64

32

16

8

4

2

1

64

32

16

8

4

2

1

64

32

16

8

4

2

1

64

32

16

8

4

2

1

64

32

16

8

4

2

1

64

32

16

8

4

2

1

64

32

16

8

4

2

1

64

32

16

8

4

2

1

64

32

16

8

4

2

1

64

32

16

8

4

2

1

64

32

16

8

4

2

1

64

32

16

8

4

2

1

64

32

16

8

4

2

1

64

32

16

8

4

2

1

64

32

16

8

4

2

1

64

32

16

8

4

2

1

64

32

16

8

4

2

1

64

32

16

8

4

2

1

64

32

16

8

4

2

1

64

32

16

8

4

2

1

64

32

16

8

4

2

1

64

32

16

8

4

2

1

64

32

16

8

4

2

1

64

32

16

8

4

2

1

64

32

16

8

4

2

1

64

32

16

8

4

2

1

64

32

16

8

4

2

1

64

32

16

8

4

2

1

64

32

16

8

4

2

1

64

32

16

8

4

2

1

64

32

16

8

T I E R A , immunisiert mit dem Viridansstamm I (31)

Die " Normaltiter " wurden als Ausgangswerte durch 3 Hämagglutinationsversuche ermittelt, die an verschiedenen Tagen vorgenommen wurden. Es stand zu erwarten, daß im Laufe der Immunisierung gegen den I-Stamm Präcipitationstiter auftreten und die Hämagglutinationstiter sich erhöhen würden.

Bereits nach der ersten Immunisierungswoche stiegen die Hämagglutinationstiter gegen das homologe I-Antigen an und erreichten nach Ablauf der 4. Immunisierungswoche einen Wert von 1:512. Die Präcipitation setzte nach der ersten Woche mit positiver Reaktion im konzentrierten Serum ein und war am Ende der 4. Woche bei einer Verdünnung 1:16 deutlich positiv.

Die homologe Absorption mit dem I-Antigen zeigte ein eindrucksvolles Absinken der Titer, das sowohl in der Hämagglutination (5 Verdünnungsstufen) als auch in der Präcipitation (2 Verd.-Stufen) eintrat. Bei heterologer Absorption mit dem II-Antigen sank der Hämagglutinationstiter geringfügig um eine Stufe. (Fehlerbreite !)

Ein ähnliches Verhalten zeigten die Titerabläufe gegen die Viridansantigene Ia und III, sowie gegen das D-Antigen (Enterok.). Gegen das Ia-Antigen erreichten Hämagglutinations- und Präcipitationstiter dieselben Werte wie gegen das I-Antigen; entsprechend verhielt sich der Titerablauf gegen das D-Antigen. Auch in diesen Fällen konnten die Titer wohl homolog (I), nicht dagegen heterolog (II) absorbiert werden. Gegen das III-Antigen stiegen die Hämagglutinationstiter ebenfalls an; eine Präcipitation trat jedoch nicht auf.

Gegen die Antigene der Viridansgruppen II und IIa sowie gegen den A-Stamm (S 84) konnte erwartungsgemäß keine Titererhöhung festgestellt werden. Mit dem homologen I-Antigen konnten die Hämagglutinationstiter

gegen I-, Ia und D-Antigen in annähernd demselben Maße absorbiert werden (4 - 5 Stufen), etwas weniger der Titer gegen das III-Antigen (3 Stufen).

Aus den bei Tier A beobachteten Präcipitations- und Hämagglutinationstitern war auf eine antigenetische Verwandtschaft zwischen den Viridansstämmen I, Ia und III zu schließen, wie es nach Selbie für das I- und Ia- Antigen zu erwarten und für das III- Antigen möglich war.

Darüber hinaus war noch auf eine Antigengemeinschaft dieser Stämme mit dem D- Antigen zu schließen. Dieser Befund soll in der Diskussion erörtert werden.-

TIER B

1024

512

256

128

64

32

16

8

4

2

1

0.5

0.25

0.125

0.0625

0.03125

0.015625

0.0078125

0.00390625

0.001953125

0.0009765625

0.00048828125

0.000244140625

0.0001220703125

0.00006103515625

0.000030517578125

0.0000152587890625

0.00000762939453125

0.000003814697265625

0.0000019073486328125

0.00000095367431640625

0.000000476837158203125

0.0000002384185791015625

0.00000011920928955078125

0.000000059604644775390625

0.0000000298023223876953125

0.00000001490116119384765625

0.000000007450580596923828125

0.0000000037252902984619140625

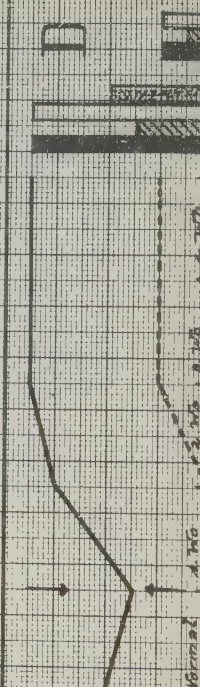
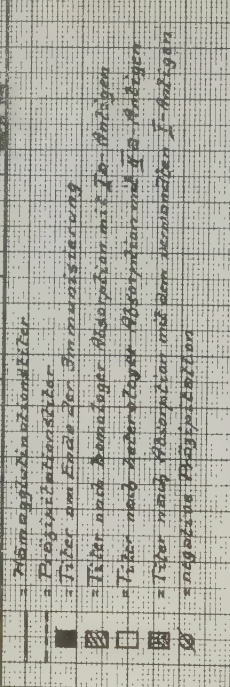
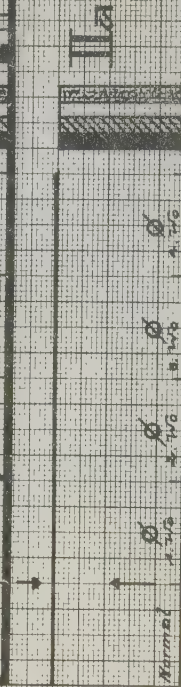
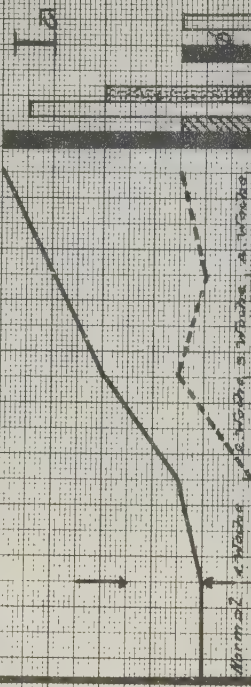
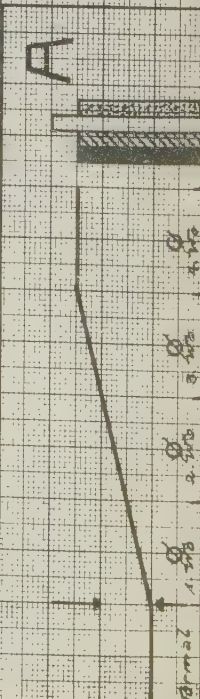
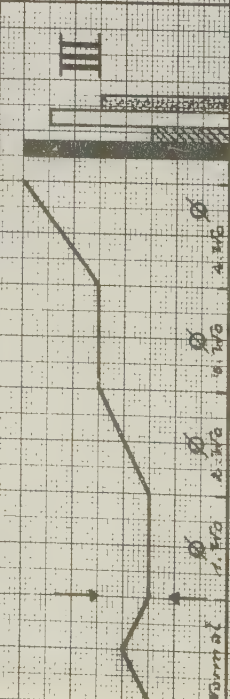
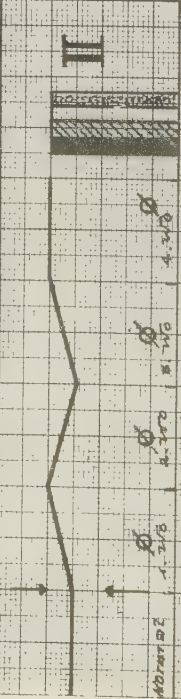
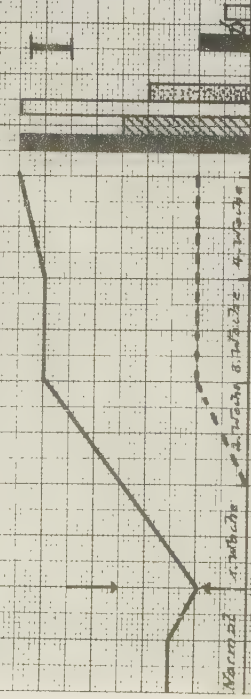
0.00000000186264514923095703125

0.000000000931322574615478515625

0.0000000004656612873077392578125

0.00000000023283064365386962890625

0.000000000116415321826934814453125



Normale

1. Woche

2. Woche

3. Woche

4. Woche

1. Woche

2. Woche

3. Woche

4. Woche

1. Woche

2. Woche

3. Woche

4. Woche

1. Woche

2. Woche

3. Woche

4. Woche

1. Woche

2. Woche

3. Woche

4. Woche

Normale

1. Woche

2. Woche

3. Woche

4. Woche

1. Woche

2. Woche

3. Woche

4. Woche

1. Woche

2. Woche

3. Woche

4. Woche

1. Woche

2. Woche

3. Woche

4. Woche

1. Woche

2. Woche

3. Woche

4. Woche

Normale

1. Woche

2. Woche

3. Woche

4. Woche

1. Woche

2. Woche

3. Woche

4. Woche

1. Woche

2. Woche

3. Woche

4. Woche

1. Woche

2. Woche

3. Woche

4. Woche

1. Woche

2. Woche

3. Woche

4. Woche

Normale

1. Woche

2. Woche

3. Woche

4. Woche

1. Woche

2. Woche

3. Woche

4. Woche

1. Woche

2. Woche

3. Woche

4. Woche

1. Woche

2. Woche

3. Woche

4. Woche

1. Woche

2. Woche

3. Woche

4. Woche

Normale

1. Woche

2. Woche

3. Woche

4. Woche

1. Woche

2. Woche

3. Woche

4. Woche

1. Woche

2. Woche

3. Woche

4. Woche

1. Woche

2. Woche

3. Woche

4. Woche

1. Woche

2. Woche

3. Woche

4. Woche

Normale

1. Woche

2. Woche

3. Woche

4. Woche

1. Woche

2. Woche

3. Woche

4. Woche

1. Woche

2. Woche

3. Woche

4. Woche

1. Woche

2. Woche

3. Woche

4. Woche

1. Woche

2. Woche

3. Woche

4. Woche

Normale

1. Woche

2. Woche

3. Woche

4. Woche

1. Woche

2. Woche

3. Woche

4. Woche

1. Woche

2. Woche

3. Woche

4. Woche

1. Woche

2. Woche

3. Woche

4. Woche

1. Woche

2. Woche

3. Woche

4. Woche

Normale

1. Woche

2. Woche

3. Woche

4. Woche

1. Woche

2. Woche

3. Woche

4. Woche

1. Woche

2. Woche

3. Woche

4. Woche

1. Woche

2. Woche

3. Woche

4. Woche

1. Woche

2. Woche

3. Woche

4. Woche

Normale

1. Woche

2. Woche

3. Woche

4. Woche

1. Woche

2. Woche

3. Woche

4. Woche

1. Woche

2. Woche

3. Woche

4. Woche

1. Woche

2. Woche

3. Woche

4. Woche

1. Woche

2. Woche

3. Woche

4. Woche

Normale

1. Woche

2. Woche

3. Woche

4. Woche

1. Woche

2. Woche

3. Woche

4. Woche

1. Woche

2. Woche

3. Woche

4. Woche

1. Woche

2. Woche

3. Woche

4. Woche

1. Woche

2. Woche

3. Woche

4. Woche

Normale

1. Woche

2. Woche

3. Woche

4. Woche

1. Woche

T I E R B. immunisiert mit Viridansstamm Ia (361 Ia)

Es stand hier zu erwarten, daß sich im Laufe der Immunisierung die Hämagglutinations- und Präcipitations-titer gegen den homologen Ia- Stamm erhöhen würden. Nach den Befunden bei Tier A lag die Folgerung nahe, daß sich möglicherweise auch Titeranstiege gegen die Stämme I und III ergeben könnten.

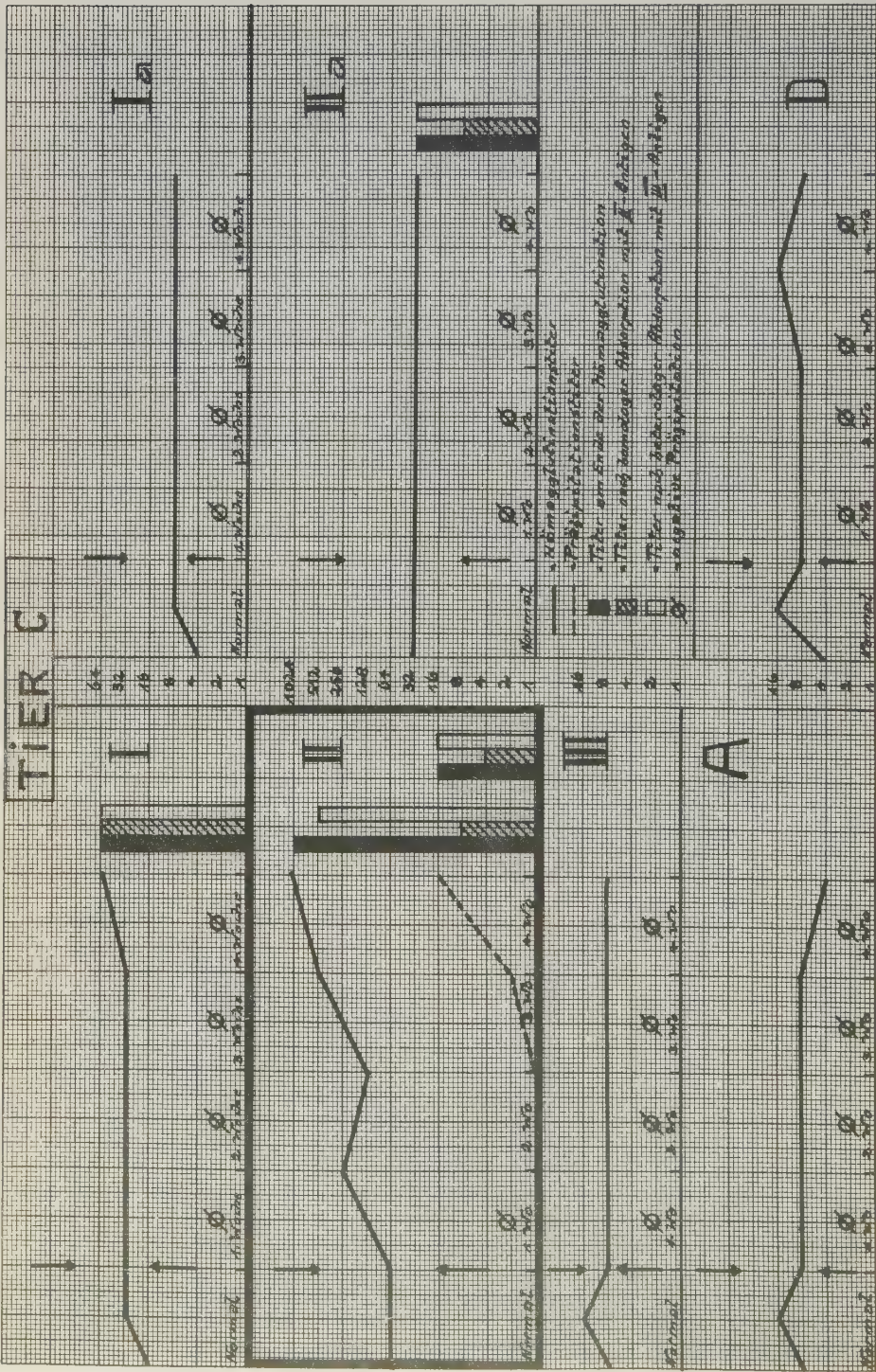
Die Kurve gegen das homologe Antigen zeigt von der ersten Immunisierungswoche an einen deutlichen Anstieg der Hämagglutinations- und Präcipitationstiter. Die Titer gegen das homologe Antigen Ia und das verwandte Antigen I zeigten einen annähernd gleichen Verlauf. Auch gegen das III-Antigen erfolgte ein deutlicher Anstieg der Hämagglutinationswerte; gegen das Enterokokken-Antigen D ergab sich eine Erhöhung sowohl der Hämagglutinations- als auch der Präcipitationstiter. Dagegen blieben die Titer gegen die Viridansantigene II und IIa unverändert und stiegen gegen das A- Antigen (S 84) nur gering an.

Die homologe Absorption mit Ia- Antigen zeigte gegen I, Ia, III und D eine deutliche Verminderung der Titer. Das heterologe IIa - Antigen absorbierte nicht.

Ein weiterer Absorptionsversuch wurde mit dem verwandten I- Antigen durchgeführt; es traten geringe Abweichungen gegenüber dem Absorptionsbefund mit dem homologen Ia- Antigen auf.

Aus den bei Tier B beobachteten Hämagglutinations- und Präcipitationsbefunden sowie Absorptionsversuchen war auf eine antigenetische Verwandtschaft zwischen den Viridansantigenen I, Ia und III untereinander und außerdem auf eine Verwandtschaft dieser drei Viridansantigene zu dem D-Stamm zu schließen. Diese Schlußfolgerungen hatten sich bereits aus den bei Tier A beobachteten Titerabläufen ergeben. Sie soll in der Diskussion weiter erörtert werden.-

TIER C



T I E R C, immunisiert mit Viridansstamm II (111)

Erwartungsgemäß ließen sich gegen das homologe Antigen sowohl in der Hämagglutination als auch in der Präcipitation Titeranstiege nachweisen, die bei homologer Absorption mit dem II- Antigen eine deutliche Verminderung zeigten (Hämagglutination 7, Präcipitation 2 Stufen).

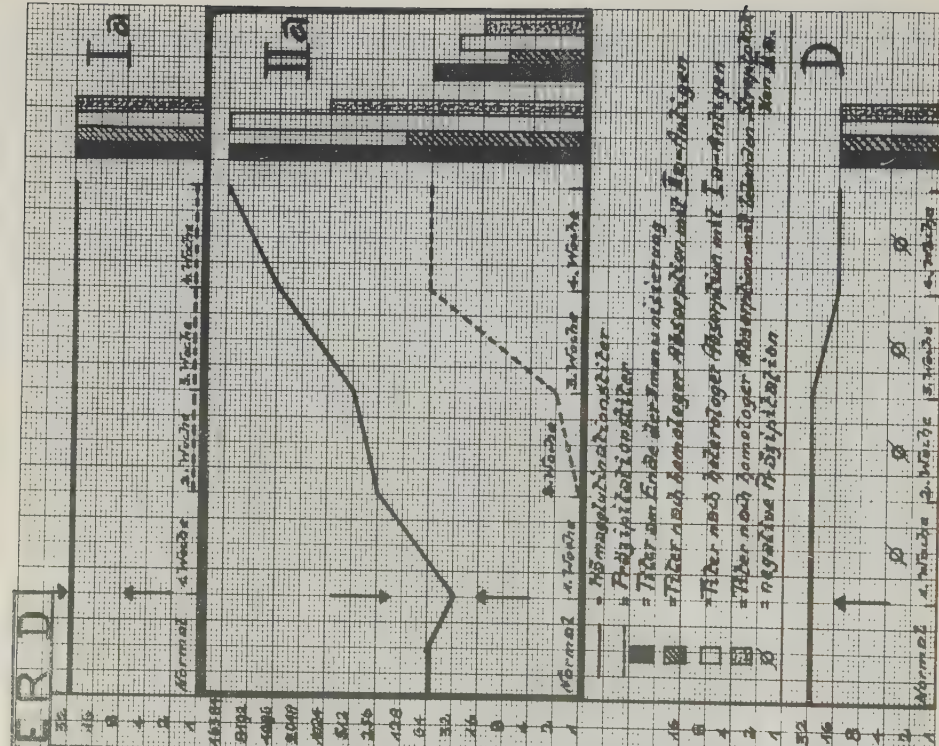
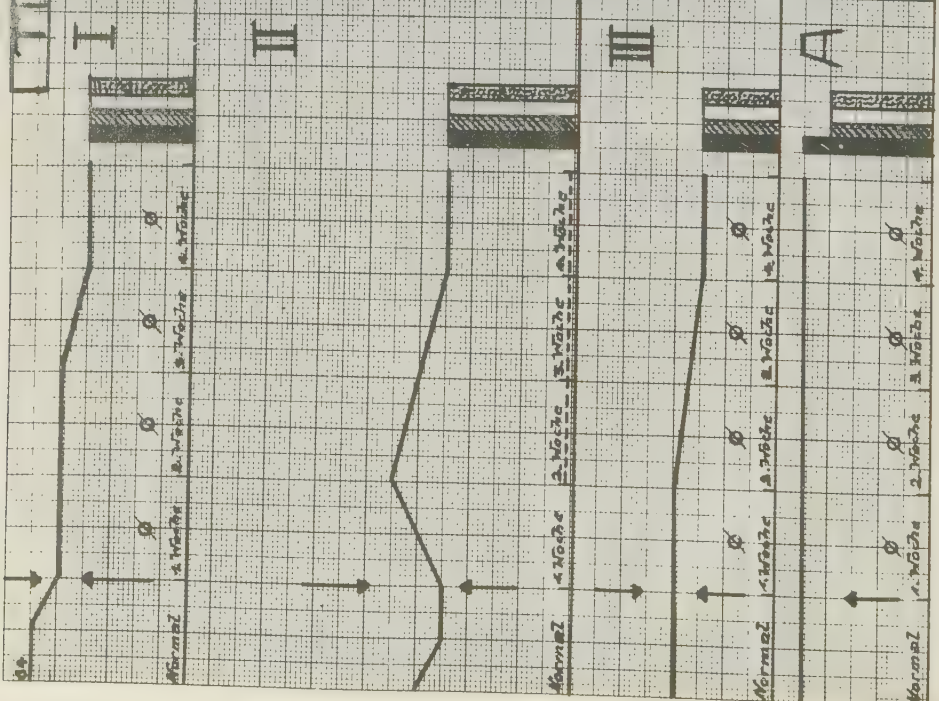
Gegen das verwandte IIa- Antigen ließ sich jedoch keinerlei Titererhöhung nachweisen. Auch eine Präcipitation trat nicht ein. Allerdings fiel der Hämagglutinationstiter gegen das IIa- Antigen nach homologer Absorption mit dem II- Antigen geringgradig ab (2 Stufen).

Die heterologe Absorption wurde mit dem III-Antigen durchgeführt und ergab gegenüber den Hämagglutinationstitern am Ende der Immunisierung keine Veränderung.

Aus den Präcipitations- und Hämagglutinationstitern bei Titer C ergaben sich keine gesicherten Beobachtungen, die auf eine antigenetische Verwandtschaft zwischen dem zur Immunisierung benutzten II- Antigen und den übrigen 6 Stämmen schließen ließen. Nach der Einteilung von Selbie war zu erwarten, daß eine Antigengemeinschaft zwischen dem II- und IIa- Antigen zum Ausdruck gekommen wäre.

Auf diese Diskrepanz soll in der Diskussion eingegangen werden.

TIER D



- = Homoglotinalisation
- = Felsipitotisation
- ▨ = Teller am Ende der Homotisation
- = Teller nach homotologer Homotisation mit Teller
- ▤ = Teller nach homotologer Homotisation mit Teller
- ⊗ = Teller nach homotologer Homotisation mit Teller
- ⊙ = Teller nach homotologer Homotisation mit Teller

T I E R D, immunis. mit Viridansantigen I Ia (26 I Ia)

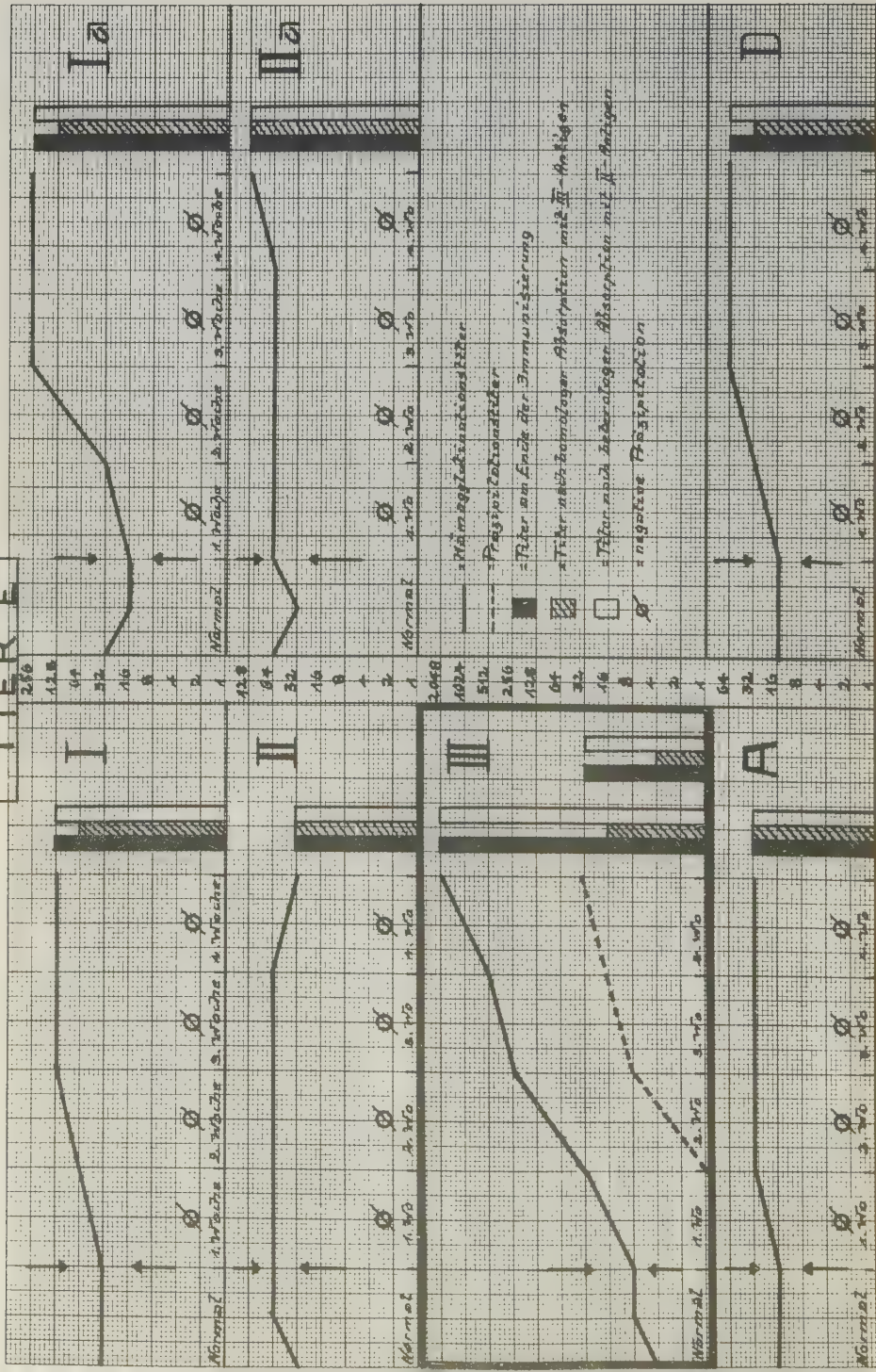
Die Hämagglutinations- und Präzipitationstiter stiegen nach der ersten Woche gegen das homologe I Ia- Antigen an. Sie erreichten bis zum Ende der letzten Immunisierungsperiode eine Verdünnung von 1:64 für die Präzipitation und 1:16.384 für die Hämagglutination. Die homologe Absorption mit I Ia - Antigen zeigte in Hämagglutination und Präzipitation ein deutliches Absinken der Titer. Die heterologe Absorption mit I a- Antigen veränderte den Hämagglutinationstiter nicht und senkte die Präzipitation um eine Stufe.

Mit dem Serum von Tier D wurde ferner ein Absorptionsversuch mit lebenden Streptokokken des homologen I Ia-Stammes durchgeführt. Im Gegensatz zu der Absorption mit flüssigem I Ia- Antigen senkte die Absorption mit intakten Streptokokken den Hämagglutinationstiter nur um 4 (7), den Präzipitationstiter um 2 (3) Stufen. Demnach ist die absorbierende Kraft der intakten Streptokokken anscheinend nicht in demselben Maße wirksam wie die der Streptokokkenextrakte. Diese Tatsache mag darauf beruhen, daß die als Antigen bekannten Streptokokkenextrakte den antigenen Molekularkomplex (Polysaccharid) in freier Lösung enthalten, während im anderen Falle das Antigen, am Eiweiß gebunden, im Streptokokken-Organismus verbleibt und, darin eingeschlossen, wohl nur in geringerem Umfang wirksam werden kann.

Die Erwartungen, daß sich die Titer gegen das als verwandt geltende Viridans-II-Antigen erhöhen würden, bestätigten sich nicht. Die Präzipitation gegen das II-Antigen ergab allerdings von der ersten Immunisationswoche an im konz.Serum eine positive Reaktion, die bis zum Ende der Immunisierung anhielt, aber nicht weiter anstieg. Dieses Verhalten soll im folgenden Abschnitt diskutiert werden. Die Hämagglutinationstiter gegen die übrigen Antigene I, I a, III, A und D verhielten sich erwartungsgemäß unverändert.

Unerwartet trat am Ende der 1. Immunisierungswoche im konz.Serum eine Präzipitation gegen das I a- Antigen auf. Auch diese Tatsache soll noch erläutert werden.

TIERE



T I E R E, immunisiert mit Viridansstamm III (17III)

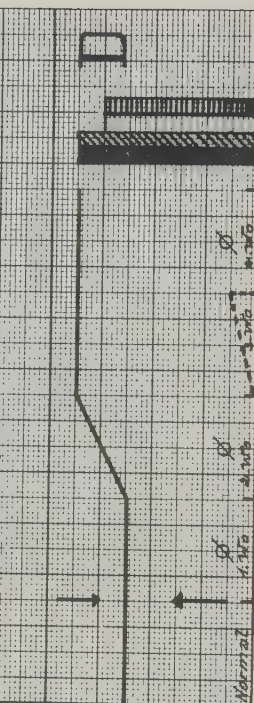
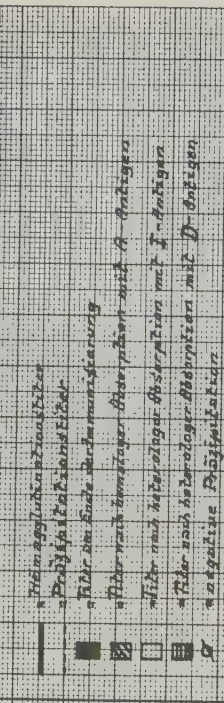
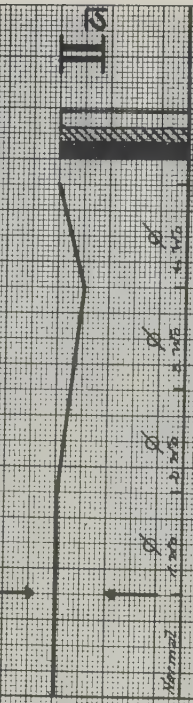
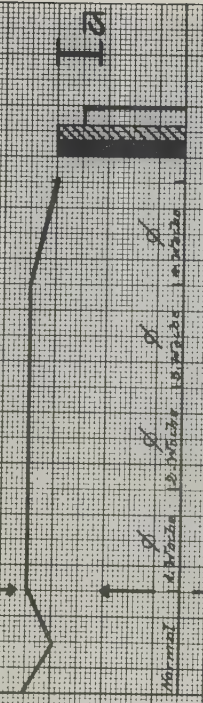
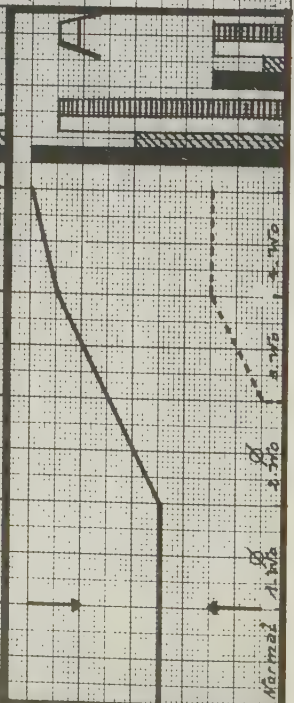
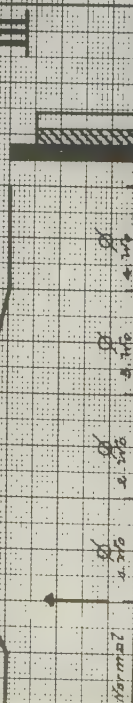
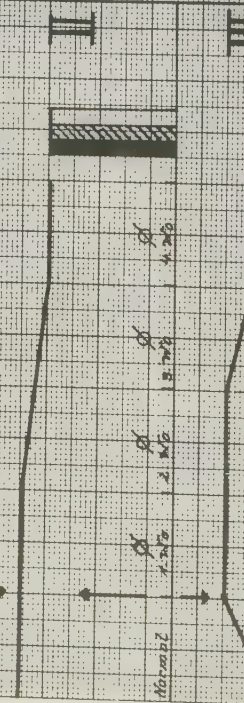
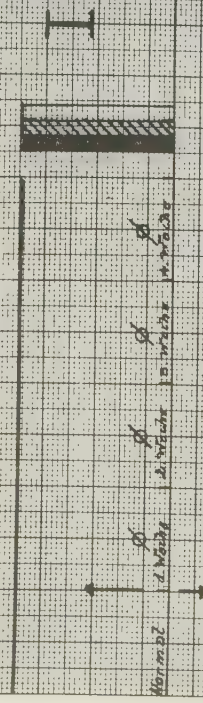
Die Hämagglutinationstiter gegen das homologe III-Antigen stiegen nach der ersten Woche an und erreichten gegen Ende der Immunisierungszeit Werte von 1:2048; die Präzipitation fiel bis zu einer Verdünnung 1:32 positiv aus. Die homologe Absorption mit III-Antigen ergab ein Absinken der Hämagglutinationstiter um 3 Stufen. Die heterologe Absorption mit II-Antigen ließ die Werte unverändert.

Im Verlaufe der Immunisierung traten Erhöhungen der Hämagglutinationstiter gegen die Viridansantigene I und Ia, sowie gegen das Enterokokkenantigen D auf. Präzipitationen konnten in diesen Fällen jedoch nicht nachgewiesen werden.

Diese Beobachtung deutet wiederum auf eine Verwandtschaft der antigenen Eigenschaften bei den Viridansstreptokokken I, Ia und III einerseits, und den D-Streptokokken andererseits, auf die bereits hingewiesen wurde (Tiere A und B) und die noch im besonderen Beachtung finden soll.

Im Verhalten der Hämagglutinationstiter gegen die Antigene II, IIa und A (S 84) zeigten sich keine Veränderungen; Präzipitationen wurden nicht nachgewiesen.

FILE



T I E R F, immunisiert mit β -hämolytischen Streptokokken der Lancefield-Gruppe A, Typ 3 (S 84)

Die Hämagglutinations- und Präcipitationstiter gegen das homologe A- Antigen erhöhten sich im Verlauf der Immunisierung. Die Absorption mit dem homologen Antigen ergab eine Senkung der Hämagglutinationstiter um 4 Stufen, der Präcipitationstiter um 2 Stufen. Die heterologe Absorption mit dem Viridansantigen I senkte die Hämagglutination um eine Stufe und ließ die Präcipitation unverändert. Eine weitere heterologe Absorption wurde mit dem D- Antigen durchgeführt; beide heterologen Absorptionen ergaben dieselben Werte.

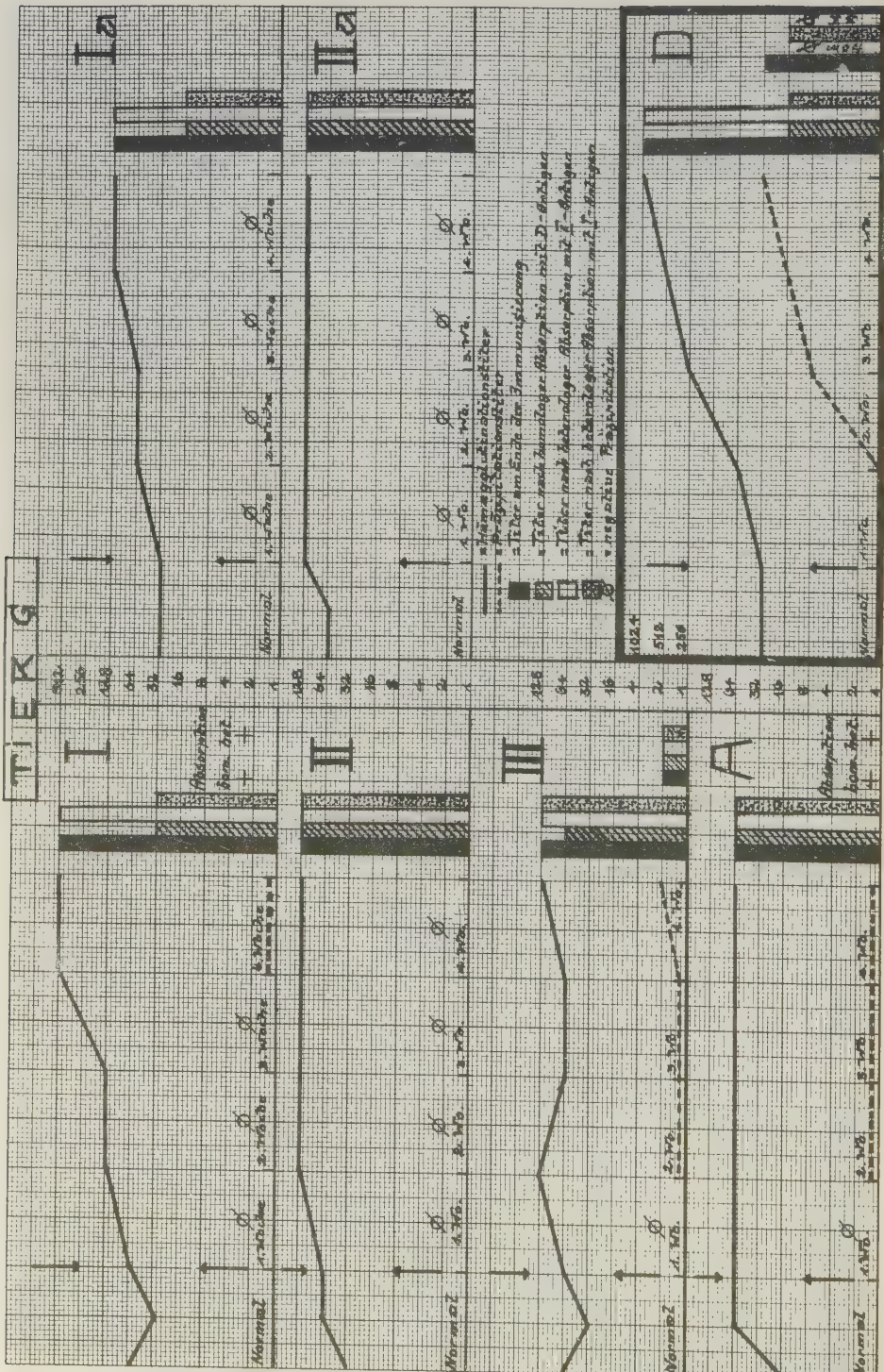
Die Hämagglutinationstiter gegen die Viridans- Antigene I, Ia, II, IIa und III zeigten während der Immunisierung keine Veränderungen. Präcipitationen traten nicht auf.

Das D- Antigen reagierte zu Ende der 2. Woche mit einem leichten Hämagglutinationstiteranstieg; parallel dazu trat eine Präcipitation im konz. Serum auf, die nach einer weiteren Immunisationsperiode auch in einer Verdünnung 1:2 nachzuweisen war. Am Ende der 4. Woche war die Präcipitation jedoch wieder eindeutig negativ.

Eine Erklärung für diese überraschende Reaktion fanden wir nicht. Die Möglichkeit einer antigenetischen Verwandtschaft zwischen dem A- und dem D- Antigen konnte durch den negativen Ausfall des Absorptionsversuches mit dem D- Antigen ausgeschlossen werden.

Es scheint sich demnach bei dem Hämagglutinations- und Präcipitationstiteranstieg gegen das heterologe D- Antigen um eine sogenannte unspezifische " cross- reaction " gehandelt zu haben, wie sie von Frau L a n c e f i e l d für andere Gruppen beschrieben worden sind. (11; 5; S. 195)

TIERG



T I E R G, immunisiert mit Streptokokkenstamm 831 D
(Enterokokken; Gruppe D n.Lancefield)

Die Hämagglutinations- und Präzipitationstiter stiegen gegen das homologe D- Antigen an. Nach homologer Absorption sanken die Hämagglutinationswerte um 6, die Präzipitationswerte um 5 Stufen. Eine weitere Absorption mit Viridans-I- Antigen führte zu genau denselben Werten wie die Absorption mit dem homologen Enterokokken-D-Antigen, während die heterologe Absorption mit IIa - Viridans - Antigen keine Titeränderung brachte.

Ein Hämagglutinationstiteranstieg wurde ferner gegen das I- und Ia- Antigen beobachtet. Eine positive Präzipitation im konz. Serum ergab sich ab der 3. Immunisationswoche gegen das I- Antigen, nicht jedoch gegen das Ia- Antigen. Gegen das III- Antigen zeigte sich kein Anstieg der Hämagglutinationswerte. Im Verlauf der Immunisierung trat jedoch nach der 2. Woche eine positive Präzipitation ein, die später auch in einer Verdünnung 1 : 2 nachweisbar war und sowohl bei homologer Absorption mit D- Antigen als auch bei heterologer Absorption mit den Antigen I und IIa bestehen blieb.

Auch in diesem Fall zeigte sich also eine gemeinsame Reaktionsbereitschaft der Viridans- Antigene I und Ia, (- bis zu einem gewissen Grade auch III-) mit dem D-Antigen: die Hämagglutinationstiter stiegen gegen das D- Antigen um 5, gegen das I- Antigen um 3 und gegen das Ia- Antigen um 2 Stufen. Präzipitationen traten mit D-, I- und III-Antigen ein. Absorptionsversuche ergaben mit dem homologen D- Antigen ebenso wie mit dem I- Viridans- Antigen eine Senkung der Hämagglutinationstiter gegen I, Ia und D. Dieses Verhalten weist wiederum auf die schon erwähnte Antigen- Verwandtschaft der bezeichneten Stämme hin.

Die Präzipitations- und Hämagglutinationstiter gegen II und IIa erhöhten sich nicht; auch gegen das A- An-

tigen zeigte die Hämagglutination keine Änderung der Werte. Allerdings trat hier nach der 2. Immunisierungswoche eine positive Präzipitation im konzentrierten Serum ein. Diese Präzipitation des Anti - D - Serums gegen das A - Antigen ist wahrscheinlich ebenfalls wie bei dem mit dem A - Stamm immunisierten Tiere F gegen das D - Antigen eine unspezifische Kreuz- Reaktion im Sinne von Lancefield. (5; 11;)

Die Diskussion wird diese Frage eingehend erörtern.

IV. DISKUSSION

Mit den vorstehend beschriebenen Tierversuchen sollte vor allen Dingen die Frage geklärt werden, ob die Hämagglutinationsmethode geeignet sei zum Nachweis von Antikörpern gegen Streptokokken. Dazu wurden parallel mit der Hämagglutination bei allen Tieren in allen Serien Präcipitationen vorgenommen.

Die Präcipitationsmethode ergibt nach den Arbeiten von Frau L a n c e f i e l d und von zahlreichen Nachuntersuchern den Nachweis von Streptokokkenantikörpern. Dieser Antikörpernachweis wird als streng spezifisch angesehen (5; 11;). Wie Frau Lancefield beschreibt, präcipitieren zwar die Sera einiger weniger Tiere nach Immunisierung zuweilen auch mit fremden, nicht zur Immunisation benutzten Antigenen. Frau Lancefield führt dieses Verhalten einzelner Kaninchenserum auf eine besondere, nicht näher bestimmbare, mit Antikörpern nicht identische Eigenschaft der betreffenden Tiere zurück. Diese " cross - reactions " sind jedoch so selten, daß sie den Wert der Präcipitationsmethode für die serologische Streptokokkendifferenzierung nicht einschränken.

Es ergibt sich jedoch allein aus der Tatsache des Vorkommens solcher Kreuzreaktionen, daß es nicht möglich ist, aus den Immunisierungsversuchen an einem einzigen Tier eine zuverlässige Aussage zu treffen über die Antigenstruktur eines Stammes bzw. über Antigenverwandtschaften zwischen mehreren Stämmen. Soweit deshalb im folgenden Antigenverwandtschaften zwischen einzelnen Stämmen erörtert werden, kommt diesen Darlegungen nur eine bedingte Beweiskraft zu, weil in der vorliegenden Untersuchung jeweils nur ein Tier mit einem Stamm immunisiert wurde.

Es war auch nicht das Ziel dieser Arbeit, beweisende Aussagen über Antigenverwandtschaften zwischen ein-

zellen Streptokokkenstämmen zu treffen; andererseits müssen diese antigenetischen Verwandtschaftsverhältnisse zur Klärung der Spezifität der Hämagglutinationsmethode erörtert werden.-

1. SPEZIFITÄT DER HÄMAGGLUTINATIONSMETHODE

Zum Nachweis der Antikörpernatur eines Serumbestandteils werden folgende Bedingungen verlangt (19; S.712; 27;) :

- a) seine spezifische Bindung an das homologe Antigen;
- b) seine Hitzebeständigkeit bei 56°;
- c) seine Dissoziierbarkeit vom Antigen.

Sowohl für den präzipitierenden als auch für den hämagglutinierenden Serumfaktor wurde die Hitzebeständigkeit dadurch nachgewiesen, daß die Sera inaktiviert (30 Min.Wasserbad bei 56°) zur Untersuchung kamen.

Eine Abspregung der an das Antigen gebundenen Antikörper ist praktisch nur dann möglich, wenn das Antigen noch in korpuskulärer Form vorliegt. Dagegen ist die Sprengung einer Antigen-Antikörper-Bindung nur schwer nachzuweisen, wenn auch das Antigen- wie bei den vorliegenden Untersuchungen- in flüssiger Form benutzt wird.

Es wurde deshalb, wie bereits erwähnt, in dieser Arbeit versucht, die fraglichen, an sensibilisierte Erythrozyten gebundenen Antikörper nach der von D a h r (22;S.204 f.) angegebenen Methode durch Hitzebehandlung abzusprengen. Dabei war zu erwarten, daß der Antigen-Antikörper-Komplex unter Einwirkung der Temperatur (30 Min.bei 56°) dissoziieren würde. In unserem Fall wurden jedoch die sensibilisierten Erythrozyten hämolytisch, und die Abspregflüssigkeit ergab keine verwertbaren Hämagglutinationsbefunde.

Abspregversuche zum Nachweis der Antikörpernatur des hämagglutinierenden Serumfaktors liegen demnach für die hier beschriebenen Untersuchungen nicht vor.

Die spezifische Bindung des hämagglutinierenden Serumfaktors an das homologe Antigen war nachzuweisen durch Absorptionsversuche. Es wurden daher am Ende der Immunisierung Absorptionen sowohl für die Hämagglutination mit dem homologen, zur Immunisierung benutzten Stamm als auch mit heterologen Stämmen durchgeführt.

Dabei waren im allgemeinen die Ergebnisse der Absorptionsversuche für die Präcipitation schwerer zu beurteilen, weil die Präcipitationstiter häufig nur Serumverdünnungen von 1:8 oder 1:16 erreichten. Aus diesem Grunde wurde das einzelne Serum für die Präcipitation jeweils nur einmal absorbiert, für die Hämagglutination mit ihren deutlich erhöhten Titern dagegen dreimal. Wenn nämlich für die Präcipitation nach der hier benutzten Technik ebenfalls drei Absorptionen durchgeführt worden wären, dann hätte nach der dritten Absorption bereits die Serumverdünnung 1:8 resultiert. Damit wären allein durch diese Verdünnung in mehreren Fällen die Präcipitationen " ($\pm$) " oder negativ geworden, zB. wenn der ursprüngliche Präcipitationstiter bei 1:8 gelegen hätte (Tiere B und F). Solchen Absorptionsversuchen wäre dann in Bezug auf die Präcipitation keine Beweiskraft zugekommen.

Nach der dritten Absorption der Sera für die Hämagglutination resultierte die Serumverdünnung 1:8; durch Vermischung mit gleichen Teilen der Suspension sensibilisierter Erythrozyten begann die Hämagglutinationsreihe nach der Absorption mit einer Serumverdünnung von 1:16.

Wenn in der vorliegenden Untersuchung die beobachteten Hämagglutinationstiter tatsächlich durch die Wirksamkeit von Antikörpern zustandegekommen waren, so mußte sich zunächst eine gewisse Parallelität mit den sicher durch Antikörper hervorgerufenen Präcipitationstitern zeigen. Ferner mußten sich die Hämagglutinationstiter genau so wie die Präcipitationstiter homolog gut und heterolog nicht oder nur wenig absorbieren lassen.

Eine eindeutige Parallelität zwischen Hämagglutinations- und Präcipitationstiterkurven fand sich bei allen sieben Tieren für den zur Immunisierung benutzten homo-

gen Stamm. Dabei ließen sich bei allen sieben Tieren die Hämagglutinationstiter gegen den homologen Stamm um 4 bis 7 Serumverdünnungsstufen, die Präcipitationstiter um 2 bis 5 Stufen homolog absorbieren, während die Absorption mit heterologen Stämmen die Hämagglutinations- wie auch die Präcipitationstiter gar nicht oder nur um eine Serumverdünnungsstufe senkte. Durch die Parallelität zwischen Hämagglutinations- und Präcipitationstiterkurven und die genannten Resultate der Absorptionsversuche erscheint nachgewiesen, daß es sich beim Zustandekommen der beobachteten Hämagglutinationstitersteigerungen ausschließlich um die Wirksamkeit von Antikörpern gehandelt hat.

Dagegen ließ sich mit den vorliegenden Untersuchungen nicht klären, ob auch die vor der Immunisierung bei allen sieben Tieren nachweisbaren sogenannten "Normaltiter" gegen alle sieben Antigene auf das Vorhandensein von spezifischen "Normal - Antikörpern" zurückzuführen waren. Diese Normaltiter lagen zwischen den Serumverdünnungsstufen 1:4 und 1:64 und waren deshalb allein nach der Titerhöhe für verwertbare Absorptionsversuche nicht geeignet.

Die Hämagglutinationstiter lagen am Ende der Immunisierung um 5 bis 7 Serumverdünnungsstufen höher als die Präcipitationstiter. Der Anstieg der Hämagglutinationstiterkurve setzte etwa um eine Woche (eine Immunisierungsperiode) vor Auftreten der Präcipitation ein.

2. ANTIGENGEMEINSCHAFTEN DER BENUTZTEN STÄMME.

Nach der in der Einleitung zum Abschnitt " Ergebnisse " erörterten Einteilung der Viridansstreptokokken nach Se l b i e (12) war bei den vorliegenden Untersuchungen zu erwarten, daß sich auch die Antigenverwandtschaft

einzelner Stämme in den Hämagglutinations- und Präcipitationstiter ausdrücken würde. Andererseits wurde bereits darauf hingewiesen, daß aus diesen jeweils nur an einem Tiere durchgeführten Immunisierungsversuchen mit einem Stamm keine endgültigen Schlüsse auf Antigenverwandtschaften zu ziehen sind.

So war zu erwarten, daß der jeweilige a-Stamm nach Selbie (Ia und IIa) mit den Vertretern der Hauptgruppe (I und II) in den Titerkurven in etwa parallel gehen würde und umgekehrt. (Vergl. hierzu die Tabelle nach Selbie.)

Dieses zu erwartende Verhalten zeigten die Tiere A und B, die mit dem I- und Ia- Stamm immunisiert worden waren. Hier stiegen sowohl bei Tier A (immunis. mit I) die Hämagglutinations- und Präcipitationstiter gegen Ia an, als auch bei Tier B (immunis. mit Ia) die Titer gegen I. Das Antigen I zeigte dieselbe absorbierende Kraft sowohl für die I- als auch für die Ia-Antikörper und umgekehrt. Damit schien eine Antigengemeinschaft des I- und Ia- Stammes nachgewiesen.

Dagegen fand sich die zu erwartende Parallelität zwischen den Titerkurven des II- und IIa- Stammes in der Hämagglutination überhaupt nicht und in der Präcipitation nur angedeutet. Bei Tier C (immunis. mit dem II- Stamm) stiegen zwar die Hämagglutinations- und Präcipitationstiter gegen den homologen II- Stamm deutlich an, dagegen nicht gegen den mutmaßlich antigenetisch verwandten IIa- Stamm. Bei Tier D (immunis. mit dem IIa- Stamm) trat ein deutlicher Anstieg der Hämagglutinations- und Präcipitations- Titerkurven gegen den homologen IIa- Stamm auf, jedoch keine Erhöhung der Hämagglutinationswerte gegen den mutmaßlich verwandten II-Stamm. In der Präcipitation fand sich bei diesem mit dem IIa-Stamm immunisierten Tiere zwar bereits am Ende der ersten Immunisierungsperiode im unverdünnten Serum eine Ringbildung gegen das II-Antigen, jedoch stieg dieser Präcipitationstiter bis zum Ende der Immunisierung nicht weiter an. Desgleichen trat im konzentrierten Serum eine Präci-

pititation gegen das Ia - Antigen auf, die ebenfalls in den verdünnten Seren nicht nachzuweisen war.

Aus den Befunden bei den beiden mit dem II- und IIa-Stamm immunisierten Tieren ließ sich demnach kein gesicherter Anhalt für eine Antigengemeinschaft zwischen diesen beiden Stämmen ableiten. Es ist jedoch nach der Selbie'schen Gruppenreaktionen eine Mitreaktion zwischen dem II-, IIa- und Ia- Antigen möglich, wie sie bei dem mit IIa immunisierten Tier D beobachtet wurde.

Es ist nach der Selbie'schen Klassifizierung weiterhin möglich, daß ein einzelner, nach dem Großteil seiner antigenen Eigenschaften in die IIa- Gruppe zu rechnender Stamm trotzdem keine Antigengemeinschaft mit einem nach dem überwiegenden Anteil seiner Antigene in die II- Gruppe zu rechnenden Stamm besitzt.

Die Klassifizierung der Viridansstämmen nach Selbie erfolgte nach Gruppenmerkmalen; damit ist jedoch noch keine Bestimmung der Identität eines einzelnen Stammes möglich, weil, wie H. S c h m i d t (5; S. 197) betont, die Selbie'sche Gruppeneinteilung noch keine Typendifferenzierung innerhalb dieser Gruppen erlaubt. Unter Benutzung dieser Einteilung kann daher ein Stamm der Viridansgruppe lediglich nach seinen hauptsächlichsten antigenen Eigenschaften in eine der fünf Gruppen eingeordnet werden, nicht jedoch in seiner gesamten Antigenstruktur bestimmt werden.

Bei den von Professor Selbie überlassenen, hier benutzten Stämmen ist nicht bekannt, mit welchem der acht von ihm für seine Einteilung benutzten Antisera die Stämme im einzelnen reagierten.-

Es war nach der Selbie'schen Einteilung unter Umständen auch eine Antigengemeinschaft zwischen dem III- und dem I- und Ia- Stamm zu erwarten.

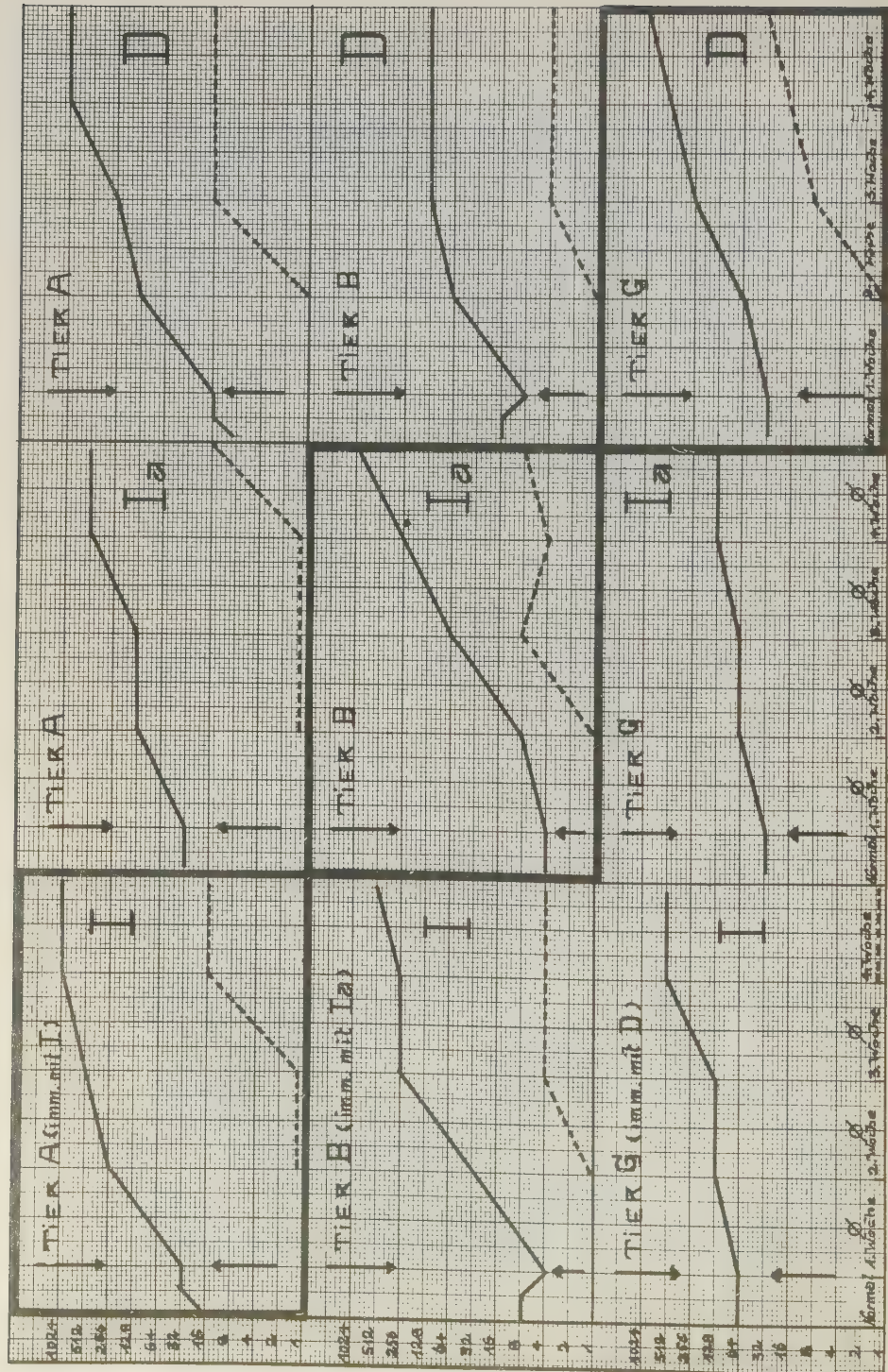
Bei Tier E (immunis. mit dem III- Stamm) stieg der Hämagglutinationstiter lediglich gegen den homologen III-Stamm deutlich an; eine Präzipitation trat ebenfalls nur

gegen das homologe III-Antigen auf. Leichte Anstiege der Hämagglutinationstiter (2 bzw. 4 Stufen) traten gegen den I-, den Ia- sowie den D- Stamm auf, jedoch, wie erwähnt, ohne Präcipitation.

Umgekehrt fanden sich ebenso Hämagglutinationstiteranstiege gegen das in diesen Fällen heterologe III-Antigen bei dem mit dem I-Stamm (Tier A, 4 Stufen;) und mit dem Ia-Stamm (Tier B, 5 Stufen;) immunisierten Kaninchen, jedoch auch bei diesen Tieren ohne Präcipitation gegen das III-Antigen . Bei diesen beiden Tieren (A und B) ließen sich die gegen das heterologe III-Antigen angestiegenen Hämagglutinationstiter am Ende der Immunisierung durch das homologe I- bzw. Ia-Antigen deutlich um 3 bis 4 Stufen absorbieren. Die bei Tier E (immunis. mit dem III-Stamm) nur mäßig gegen das I- und Ia- Antigen angestiegenen Hämagglutinationstiter wurden hier wenig (1 Stufe) durch das III-Antigen absorbiert.

Es scheint nach den Befunden von Tier A, B und E eine gewisse Antigengemeinschaft zwischen den I-, Ia- und III-Antigenen vorzuliegen.

Auffällig war die bei Tier G (immunis. gegen den D-Stamm) auftretende Präcipitation gegen das III-Antigen bis zu einer Serumverdünnung 1:2 ohne Anstieg des Hämagglutinationstiters. Dieser gegen das III-Antigen präcipitierende Faktor im Serum des gegen das D-Antigen immunisierten Tieres G ließ sich nicht durch das D-Antigen absorbieren. Nach dem Gesamtverlauf dieser Präcipitation könnte es sich dabei um eine unspezifische Kreuz-Reaktion gehandelt haben. Ein Hinweis auf eine Antigengemeinschaft zwischen dem III-Antigen und dem D-Antigen ließ sich daraus nicht ableiten. Andererseits wird noch bei der Erörterung der Befunde bei dem mit dem D-Antigen immunisierten Tier G auf die Antigengemeinschaft zwischen dem D-Antigen und dem I- bzw. Ia-Viridans-Antigen einzugehen sein, aus der auf eine ebenfalls vorliegende Antigengemeinschaft zwischen dem D- und III-Antigen zu schließen wäre. Es muß sich demnach bei der Mitpräcipitation ohne Hämagglutina-



tionstiteranstieg gegen das III-Antigen im Serum des mit dem D-Stamm immunisierten Tieres nicht unter allen Umständen um eine unspezifische Kreuzreaktion gehandelt haben.

Die bei den Immunisierungsversuchen mit den 5 Viridansstämmen gemachten und bisher diskutierten Beobachtungen ließen sich ohne Schwierigkeiten in Einklang bringen mit der Gruppeneinteilung nach Selbie.

Es wurde jedoch schon mehrfach die zunächst nicht erklärbare Mitreaktion des Viridans-I und Ia-Antigens mit dem D-Antigen nach Lancefield erwähnt. So fand sich sowohl bei Tier A (immunis. mit Viridans-I-Stamm) als auch bei Tier B (immunis. mit Viridans-Ia-Stamm) ein Titeranstieg gegen das D-Antigen in der Hämagglutination und in der Präzipitation. Die Hämagglutinationstiter gegen das als heterolog anzusehende D-Antigen ließen sich bei beiden Tieren mit dem jeweils homologen I- bzw. Ia-Antigen um je 4 Stufen absorbieren. Auch bei dem mit dem D-Stamm immunisierten Tier G trat ein geringer Titeranstieg in der in der Hämagglutination gegen das I- und Ia-Antigen auf, jedoch nur mit einer Präzipitation im konzentrierten Serum allein gegen das I-Antigen. Die Hämagglutinationstiter gegen das heterologe I- bzw. Ia-Antigen ließen sich bei Tier G mit dem zur Immunisierung verwendeten D-Antigen um 4 bzw. 3 Stufen absorbieren.

Nach diesen Befunden bei den Tieren A und B (immunis. mit Viridans-I und Ia-Stamm) und bei Tier G (immunis. mit dem D-Stamm) schien eine Antigengemeinschaft zwischen den Viridans-Antigenen einerseits und dem D-Antigen andererseits vorzuliegen. Da eine solche Verwandtschaft von vornherein ausgeschlossen schien, wurde bei Auftreten dieser Mitreaktion bei den drei Tieren zunächst an eine Verwechselung der drei zur Immunisierung benutzten Stämme untereinander gedacht.

In der nebenstehenden Tabelle sind die Hämagglutinations- und Präzipitation stiterabläufe bei den Tieren A, B und G gegen die Antigene I, Ia und D einander gegenübergestellt. (Die umrandeten Felder bezeichnen den jeweiligen Immunisationsstamm.)

Zunächst wäre es möglich gewesen, daß bei der neuherstellung von Antigen für Hämagglutination und Präcipitation eine Verwechslung erfolgt wäre. Eine solche Verwechslung hätte bedingt, daß bei den 3 Tieren das zur Immunisierung verwendete Antigen von dem zur homologen Präcipitation und Hämagglutination benutzten Antigen verschieden gewesen wäre. Daraus hätte resultiert, daß gegen den zur Immunisierung benutzten Stamm keine kontinuierlich ansteigende Titerkurve, sondern ein Titerabfall in den Antikörperreaktionen aufgetreten wäre. Außerdem hätten sich die Hämagglutinations- und Präcipitationstiter nicht homolog absorbieren lassen.

Da jedoch bei allen drei Tieren ein kontinuierlicher Anstieg in beiden Antikörperreaktionen für das homologe Antigen eintrat, der sich zudem homolog für beide Reaktionen gut absorbieren ließ, schien eine Verwechslung im Laufe der Immunisierungsversuche ausgeschlossen.

Eine weitere Verwechslungsmöglichkeit bestand darin, daß bereits vor Beginn der Impfstoffherstellung die 3 Stämme untereinander vertauscht worden waren. So hätten zB. durch Verwechslung vor Beginn der Immunisierung der I- und Ia- Stamm mit dem D-Stamm identisch sein können. Dann war, abgesehen von geringen, durch individuelle Eigenschaften der drei Tiere bedingte Titerunterschiede, zu erwarten, daß die Titerkurven der I, Ia und D immunisierten Tiere sowohl für die Präcipitation als auch für die Hämagglutination weitgehend identisch gewesen wären. Dies war jedoch nicht der Fall. Vielmehr trat bei den mit I und Ia immunisierten Tieren (A und B) zwar ein Titeranstieg in der Präcipitation auch gegen D ein, jedoch fand sich bei dem mit D immunisierten Tier, G kein eindeutiger Titeranstieg in der Präcipitation gegen I u. Ia.

Es schien demnach so, als mache der allen drei Stämmen gemeinsame Antigenanteil bei dem I- und Ia-Stamm einen Großteil des Gesamtantigens, bei dem D - Stamm dagegen nur einen kleineren Teil seiner Antigenstruktur aus.

Bildlich gesehen würde sich diese Vorstellung folgendermaßen darstellen:

Schließlich ist noch zu diskutieren, ob etwa ein unspezifischer, den Viridansstreptokokken im allgemeinen mit den D-Streptokokken gemeinsamer Antigenteil (zB. das Nukleoprotein P) diese Mitreaktion verursacht hat. Diese Annahme ist nicht wahrscheinlich, weil die Mitreaktion nur zwischen dem I- und Ia-Stamm einerseits und dem D-Stamm andererseits, nicht jedoch mit den Stämmen der II- Gruppe auftrat.

Es wurden weiterhin mit dem Anti-D-Serum der Behringwerke die Antigene des I- und Ia- Stammes sowie des D-Stammes nach Lancefield präzipitiert. Dabei trat gegen alle 3 Stämme eine eindeutige Präzipitation mit diesem Anti-D-Serum der Behringwerke auf. Außerdem wurde ein weiterer Ia -Stamm, der von Herrn Professor Selbie überlassen, der jedoch nicht zur Immunisierung verwendet worden war, mit dem Anti-D-Serum der Behringwerke präzipitiert. Auch gegen diesen zweiten Ia-Stamm trat eine eindeutige Präzipitation auf.

Schließlich fand sich noch eine schwache, nicht eindeutig positive Präzipitation des in der vorliegenden Arbeit ebenfalls zur Immunisierung benutzten Viridans-III- Stammes (Tier E) gegen das Anti -D-Serum der Behringwerke. Es wurde bereits diskutiert, daß nach der Selbie'schen Einteilung die Möglichkeit einer Antigengemeinschaft zwischen den Viridans-III-Stämmen einerseits und den Viridans-I und Ia-Stämmen andererseits besteht. Diese Antigengemeinschaft kam, wie erwähnt, wenigstens zum Teil zum Ausdruck bei den Hämagglutinationstiterkurven der Tiere A (I), B(Ia) und E (III). Durch die eindeu-

tige Präcipitation des I- und Ia- Stammes und des hier benutzten D-Stammes mit dem Anti-Serum der Behringwerke erschien nachgewiesen, daß alle 3 Stämme (und der zur Immunisierung nicht benutzte zweite Ia-Stamm) in die in Deutschland als " D-Gruppe nach L a n c e f i e l d " bezeichnete Streptokokkengruppe zu rechnen sind.

Es wurde schon mehrfach darauf hingewiesen, daß gerade über die Differenzierung der Viridansstreptokokken wie auch der D-Streptokokken nach Lancefield noch keine Einigkeit besteht, (5; 23; 24; 28; 29;), im Gegensatz zu der allgemein angenommenen Einteilung der übrigen Gruppen nach Lancefield.

Als wesentliches biochemisches Merkmal der D-Streptokokken wird ihre Hitzeresistenz gegen 60°C über 30 Minuten angesehen. Selbie schreibt in seiner Arbeit über die serologische Differenzierung der Viridansstreptokokken (12; S.669), daß nur wenige Stämme ("only a few strains") eine Hitzeresistenz gegen 60° über 30 Minuten gezeigt hätten. Diese Stämme hätten sich in alle 5 der von ihm aufgestellten Gruppen verteilt. Selbie schreibt in derselben Arbeit weiter (S.669, in Übers.):

"Bezüglich der Verwandtschaft von Streptokokken unserer Klassifizierung mit Streptokokken der Lancefield-Gruppen fanden wir Kreuzreaktionen nur bei einem Stamm, Nr 30, der nicht von einer subakuten bakteriellen Endocarditis stammte. Dieser Stamm ist hitzeresistent, spaltet Manitol und reagiert mit dem Anti-D-Serum nach Lancefield; er reagiert aber ebenso mit fünf unserer Antisera, Nr 5, 30, 8, 3 und 10. (Siehe Tabelle mit übersetzter Beschriftung.) Er ist somit ein typischer Vertreter unserer Gruppe Ia. Drei der gegen diesen Stamm hergestellten Antisera reagierten nur mit wenigen Streptokokkenstämmen und mit keinem unserer D-Streptokokken nach Lancefield. Das vierte Antiserum jedoch, das mit dem Streptokokkenstamm nach Wachstum in seinem eigenen Antiserum hergestellt worden war, reagierte mit etwa der Hälfte unserer Stämme und ebenso mit 5 unserer 8 D-Streptokokken

nach Lancefield.

Demnach hat auch Selbie selbst solche Kreuzreaktionen zwischen seiner Viridansgruppe Ia und den D-Streptokokken nach Lancefield gefunden, wie sie in den vorliegenden Untersuchungen auftraten. Auch Frau L a n c e f i e l d berichtete in ihrer grundlegenden Arbeit über die serologische Differenzierung der hämolytischen Streptokokken von Präcipitationen einzelner Viridansstämmen gegen Anti-D-Sera (und auch gegen Anti-B-Sera)(11;S.591).

Von den hier zur Immunisierung benutzten Stämmen war lediglich der D-Stamm (831D) resistent gegen Erhitzung auf 60° über eine halbe Stunde, nicht jedoch die Stämme I, Ia , II, IIa und III nach Selbie. Herr Professor Selbie hatte bei der Überlassung der Stämme nicht mitgeteilt, welche Stämme hitzeresistent waren.- Asculin wurde gespalten von den Stämmen I, Ia und D, nicht jedoch von den Stämmen II, IIa und III. In der Kultur auf der Blutplatte (große, grauweiße Kolonien mit geringer Vergrünung) und im mikroskopischen Präparat (große, lanzettförmige Diplokokken mit Ausbildung kurzer Ketten in Bouillon) waren die I- und Ia-Stämme dem D-Stamm weitgehend ähnlich, während die II-,IIa-und III-Stämme in zarteren Kolonien wuchsen, längere Ketten aus zarten, mehr runden Einzelkokken bildeten. Morphologisch glich der IIa-Stamm am ehesten den hier bei Patienten gefundenen und von Seelmann als Viridansstreptokokken identifizierten Keimen.

Abgesehen davon, daß auch bei genauer Überprüfung der Stammhaltung kein Anhalt für eine Verwechselung gefunden werden konnte, bleibt die auffallende Tatsache bestehen, daß lediglich die drei der I- bzw. Ia-Gruppe nach Selbie angehörenden Stämme mit dem Anti-D-Serum der Behringwerke präcipitierten und kein Stamm der II-,IIa- und III-Gruppe. (Die Stämme werden einmal in jeder Woche, je 4 auf einer Blutplatte, die Viridansstämmen getrennt von den Stämmen der Lancefield-Gruppen, überimpft.)

Es ist nach den oben gemachten Darlegungen über die Unterschiede in der Antigenstruktur und nach dem unterschiedlichen Verhalten bei der Hitzeresistenzprüfung auszuschließen, daß die drei Stämme vor der Immunisierung verwechselt worden waren. Vielmehr ist es sehr wahrscheinlich, daß, wie bereits erwähnt, die drei von Selbie als Viridansstreptokokken bezeichneten Stämme (I sowie die beiden Ia -Stämme) zu der in Deutschland als D-Streptokokken nach Lancefield bezeichneten Gruppe gehören, vermutlich zu dem thermolabilen Typ A der Enterokokken (25;S.50; 26; S.165;).

Andererseits wurde durch die Mitreaktion der Viridans-I- und Ia-Stämme mit dem in Deutschland als D-Streptokokken bezeichneten Stamm die Fragestellung der vorliegenden Arbeit (Vergleich von Hämagglutinations- und Präcipitations-Titerkurven; Nachweis der Spezifität der Hämagglutination) in ihrer Beantwortung nicht erschwert, sondern gefördert. Anscheinend werden nämlich, wie aus den Beobachtungen bei dem I-, Ia- und D-Stamm ersichtlich ist, feinere Unterschiede in der Antigenstruktur durch die Hämagglutination besser erfaßt als durch die Präcipitation.

Es war, wie mehrfach erwähnt, nicht die Aufgabe der vorliegenden, mit einer beschränkten Anzahl von Versuchstieren durchgeführten Untersuchung, die Antigengemeinschaften zwischen den benutzten Stämmen nachzuweisen, -

Nach Abschluß der vorliegenden Arbeit hat Herr Professor Seelemann in Kiel die für die beschriebenen Untersuchungen benutzten Streptokokken untersucht und die Stämme 3 I, 347 Ia und 361 Ia als *Streptococcus faecium* der serologischen Gruppe D, den Stamm 831 als *Streptococcus glycerinaceus* der serologischen Gruppe D, den Stamm 111 als *Streptococcus salivarius* IV und den Stamm 17 III als *Streptococcus salivarius* I identifiziert. Damit wurde die Zugehörigkeit der I- und Ia -Stämme zur D-Gruppe bestätigt. Für die Kontrolle der vorliegenden Untersuchung möchte ich Herrn Professor Seelemann an dieser Stelle besonders danken.

3. " KREUZ - REAKTIONEN " .

Nachdem somit alle bisher diskutierten Ergebnisse der Hämagglutinations- und Präzipitationsversuche ohne Schwierigkeiten auf nachgewiesene und bekannte antigene Eigenschaften der benutzten Stämme zurückzuführen waren, ist im folgenden auf eine Unstimmigkeit einzugehen, die bei den mit dem S-hämolytischen A-Stamm und dem D-Stamm immunisierten Tieren (F und G) auftrat. Bei beiden Tieren fand sich zwar ein eindeutiger Titeranstieg sowohl in der Präzipitation als auch in der Hämagglutination gegen den homologen Stamm, aber ebenfalls eine Präzipitation gegen den jeweils heterologen A- bzw. D-Stamm, jedoch ohne eindeutigen Anstieg der Hämagglutinationstiter.

Bei Tier F (immunis. mit dem A-Stamm) trat die Präzipitation gegen den D-Stamm zweimal ein, einmal sogar bis zur Serumverdünnung 1:2. Sie verschwand aber wieder gegen Ende der Immunisation. Der Hämagglutinations- und Präzipitationstiter gegen den homologen A-Stamm ließ sich am Ende der Immunisierung, nachdem der Präzipitationstiter gegen den heterologen D-Stamm wieder verschwunden war, nicht mit dem heterologen D-Stamm absorbieren.

Bei Tier G (immunis. mit dem D-Stamm) trat schon am Ende der ersten Immunisierungsperiode gegen den heterologen A-Stamm eine Präzipitation im unverdünnten Serum auf, die bis zum Ende der Immunisierung bestehen blieb, jedoch ohne weitere Titersteigerungen.

Demnach zeigten beide Tiere, sowohl gegen den A-Stamm (Tier F) als auch das gegen den D-Stamm (Tier G) immunisierte, in der Präzipitation eine Kreuzreaktion gegen den heterologen Stamm, wobei freilich das Ausbleiben eines Titeranstieges gegen den heterologen Stamm in der Hämagglutination auffiel. Nach Art und Dauer dieser Präzipitationstiter gegen den heterologen Stamm ist anzunehmen, daß es sich bei beiden Tieren um eine unspezifische Kreuzreaktion und nicht um die Wirksamkeit von Antikörpern gehandelt haben muß.

Solche unspezifischen Kreuzreaktionen in der Präcipitation kommen nach L a n c e f i e l d (11) anscheinend besonders dann zustande, wenn bei den A-Stämmen der Impfstoff nicht durch Hitzeabtötung, sondern durch Formalin-Abtötung der Bakterien hergestellt wird. Für die vorliegenden Untersuchungen waren die A-Streptokokken zur Impfstoffherstellung mit Formalin abgetötet worden.

Weiterhin ist für solche unspezifischen Kreuzreaktionen nach Lancefield charakteristisch, daß die Kreuzpräcipitationen nur im unverdünnten Serum auftreten, wie es hier wenigstens bei Tier G (immunis. mit dem D-Stamm) der Fall war.

Für die vorliegende Untersuchung handelt es sich bei den unspezifischen Kreuzreaktionen der Tiere G und F um die einzige Unstimmigkeit, die nicht auf bekannte oder mögliche Antigengemeinschaften zwischen den beiden Stämmen zurückzuführen sind. Es ist auch nicht wahrscheinlich, daß diese beiden Kreuzreaktionen etwa durch die aus den Antigenen nicht vollständig gefällte Eiweißfraktion der Stämme - das Nukleoprotein P nach L a n c e f i e l d (13a; 42, S.385; *ibid.* S.397; 13c; 47, S.469.) - verursacht worden waren.

Frau L a n c e f i e l d beschreibt die P-Substanz als ein antigenetisch wirksames Protein der Nukleoproteinfraktion, das zum Teil Kreuzreaktionen mit ähnlichen Proteinen aus verwandten Gruppen grampositiver Kokken aufwies. (13c ; 47, S.469)

Diese P-Substanz hätte in unserem Fall den A-, D- und Viridansstreptokokken gemeinsam sein können; dann wäre aber bei dem mit dem A-Stamm immunisierten Tier F am ersten eine Mitpräcipitation mit den Viridansstämmen zu erwarten gewesen, was jedoch nicht der Fall war.

Andererseits ist bemerkenswert, daß bei den beiden die Kreuzreaktion in der Präcipitation zeigenden Tieren kein eindeutiger Anstieg in der Hämagglutination im Sinne einer Kreuzreaktion auftrat. Bei Tier G (immunis. mit dem

D-Stamm), das die gesamte Immusationsdauer hindurch die Kreuzpräzipitation im unverdünnten Serum gegen den A-Stamm zeigte, blieb der Hämagglutinationstiter gegen diesen heterologen Stamm sogar vollkommen unverändert auf derselben Titerstufe.

Es scheint demnach vielleicht so zu sein, daß in der Präzipitation leichter unspezifische Serumfaktoren zur Wirkung kommen, während in der Hämagglutination möglicherweise nur spezifische Antikörper an das Antigen gebunden werden.

Zur Überprüfung der beiden genannten Kreuzreaktionen wurden die Polysaccharid-Antigene der beiden Stämme (A und D) mit dem Anti-A-Serum und dem Anti-D-Serum der Behringwerke präcipitiert.

Dabei fand sich lediglich eine eindeutige Präcipitation des A-Stammes gegen das Anti-A-Serum und des D-Stammes gegen das Anti-D-Serum, dagegen keinerlei Kreuzreaktionen.-

V. ZUSAMMENFASSUNG:

In der Einleitung zur vorliegenden Arbeit wird die durch serologische Untersuchungen gesicherte Bedeutung der hämolytischen Streptokokken in der Pathogenese der akuten Polyarthrititis und der akuten Nephritis erörtert. Die antigenen Eigenschaften der hämolytischen Streptokokken und die Antikörper-Nachweismethoden werden dargelegt. Es wird darauf hingewiesen, daß den hämolytischen Streptokokken anscheinend für den Beginn einer akuten Polyarthrititis und Nephritis, den Viridansstreptokokken dagegen für das Fortschreiten und Chronisch-Werden dieser Erkrankungen eine gewisse ursächliche Bedeutung zukommt.

Die serologischen Eigenschaften der Viridansstreptokokken sind bisher nur wenig erforscht. Einteilungsversuche nach serologischen Merkmalen sind daher unvollständig geblieben. Aus denselben Gründen konnten keine Antikörper-Nachweismethoden gegen Viridansstreptokokken entwickelt werden, die für Reihenuntersuchungen geeignet gewesen wären. Zudem treten anscheinend auch bei massiven Infektionen durch Viridansstreptokokken - z.B. bei Endocarditis lenta - Antikörper nur in geringen Konzentrationen im Patientenserum auf.

In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb versucht, die als sehr empfindlich bezeichnete Methode der indirekten Hämagglutination zum Antikörpernachweis gegen Streptokokken der Lancefield-Gruppen und gegen Viridansstreptokokken im Tierversuch heranzuziehen.

Die Fragestellung der Immunisierungsversuche lautete:

1. Ergibt die Methode der indirekten Hämagglutination einen gesicherten Nachweis von Antikörpern gegen Streptokokken, oder spielen beim Zustande-

kommen der Hämagglutinationstiter außer den Antikörpern auch andere Serumfaktoren eine Rolle.

2. Ist die Methode der indirekten Hämagglutination empfindlicher als die Präzipitation.

Zur Immunisierung wurden insgesamt sieben Streptokokkenstämme benutzt: ein A-Stamm und ein D-Stamm nach Lancefield, sowie fünf Viridansstämme. Die Herkunft der Stämme und ihre Eigenschaften werden mitgeteilt. Die Methodik der Impfstoff- und Antigenherstellung, der Immunisierung, die Technik der Präzipitation, der indirekten Hämagglutination und Absorption wird nach der Literatur und dem eigenen Verfahren eingehend beschrieben.

Durch Absorptionsversuche konnte gesichert werden, daß die Methode der indirekten Hämagglutination bei immunisierten Kaninchen einen Antikörpernachweis sowohl für Streptokokken der Lancefield-Gruppen als auch für Viridansstreptokokken ergibt.

Der Anstieg der Hämagglutinationstiter im Laufe der Immunisierung wird anscheinend nur durch Antikörper und nicht durch unspezifische Serumfaktoren verursacht. Die Methode der indirekten Hämagglutination ergibt im Tierversuch einen Antikörpernachweis bis zu erheblich höheren Serumverdünnungen als die Präzipitation.

Zwischen einzelnen zur Immunisierung benutzten Stämmen scheinen Antigen-Gemeinschaften zu bestehen. Diese möglichen antigenetischen Verwandtschaften werden eingehend diskutiert.

Die Titerabläufe in der Hämagglutination und Präzipitation sowie Absorptionsbefunde bei den sieben Tieren werden in Kurven dargestellt.

Mit den vorliegenden Untersuchungen erscheint zwar nachgewiesen, daß die Methode der indirekten Hämagglutination zum Nachweis von Antikörpern gegen Viridansstreptokokken im Tierversuch geeignet ist. Mit diesen Tierexperimenten ist jedoch über die Brauchbarkeit dieser Methode für das menschliche Serum noch nichts ausgesagt.

Zwei vom Tierversuch verschiedene Faktoren spielen bei der Anwendung der Hämagglutinationsmethode im menschlichen Serum eine Rolle:

Zunächst erscheint es fraglich, ob bei den Viridansinfektionen des Menschen Antikörper in solchen Mengen auftreten, daß sie verwertbare Titeranstiege in der Hämagglutination hervorrufen können.

Außerdem erscheint es möglich, daß im menschlichen Serum im Gegensatz zum Tierversuch neben den Antikörpern andere, unspezifisch konglutinierende Faktoren, zB. der "rheumatische Arthritis Serum-Faktor" in der Hämagglutination wirksam werden. (30; 31; 32;) -

VI. L I T E R A T U R :

1. WINBLAD, S.
Studies in haemolytic streptococcus Fibrinolysin, Antifibrinolysin, and Streptolysin. (Lund, 1941)
2. CHRIST, P.
Serologische Untersuchungen bei Streptokokkeninfektionen. (Arbeiten aus dem Paul-Ehrlich-Institut, Ffm)
Heft 51, S.124-165 (Stuttgart, 1954)
3. SEELEMAN, M.
Referat vor der Deutschen Arbeitsgemeinschaft für Herdforschung u. Herdbekämpfung eV., Bad Nauheimer Tagung 1954
4. SCHMIDT, H.
Grundlagen der spezifischen Therapie. S. 951 (Berlin-Grünwald, 1940.)
5. SCHMIDT, H.
Fortschritte der Serologie, Lieferung 4, S.194-220 (Darmstadt, 1950)
- 5a. Fortschritte der Serologie, Lief.1 S. 3.
6. Tagungsbericht der Deutschen Arbeitsgemeinschaft f. Herdforschung u. Herdbekämpfung, eV. (1953)
7. RABL , R. und M. SEELEMAN
Z.Hygiene, 132, S.394 (1951)
8. KALBAK, K.
Experimentelle og Kliniske Undersøgelser over O-Streptolysin og Forekomsten af O-Antistreptolysin i Serum. S. 136 (Kopenhagen, 1942)
9. KOLMER, J.A.
J.Americ. Dental Ass. 45, S.139 (1953)
J.Americ.Dental Ass. 42, S. 641 (1951)
10. BÖHMIG, R. und P. KLEIN
Pathologie und Bakteriologie der Endocarditis. S. 214 (Heidelberg, 1953)

11. LANCEFIELD, R.
J.Exp. Med. 57, S.571 (1933)
12. SELBIE, F.R., SIMON, R. und R. ROBINSON
Brit. Med. J. Nr. 4629, S. 667 (1949 II)
13. LANCEFIELD, R.
 - a) J. Exp. Med. 42; S. 337 und 397 (1925)
 - b) J. Exp. Med. 47; S. 92 (1928)
 - c) J. Exp. Med. 47; S. 469 (1928 I)
14. SOLOWEY, A.T.
Brit. J. Exp. Med. 76; S. 109 (1942)
15. FULLER, A.T.
Brit. J. Exp. Path. 19; S.130 (1938)
16. SEELEMAN, M.
Biologie der bei Tieren und Menschen vorkommenden
Streptokokken.(1.Auflage Nürnberg 1948; 2.Aufl.1954)
17. LANCEFIELD, R.
Proc. Soc.Exp.Biol. and Med. 38 (1938) S. 473
18. KOLTHOFF
Säure- und Basen-Indikatoren (Springer,1932) (zit.nach
"Wissenschaftliche Tabellen 1953" der Fa. Geigy)
19. SCHMIDT, H.
Fortschritte der Serologie, Lief. 12 (Darmstadt 1953)
20. LANDSTEINER, K.
Harvard University Press, 144 (Cambridge 1945)
21. MIDDLEBROOK, G. und R. DUBOS
J.Exp.Med. 88; S 521 (1948)
22. DAHR, P.
Die Technik der Blutgruppen- und Blutfaktorenbestimmung S.204 (Stuttgart, 1948)
23. GRUMBACH, A.
Schweiz. Z. Path. und Bakt. 6; S.66 (1943)
24. GRUMBACH, A. und A. SCHNETZ
Schweiz.Z. Path. und Bakt. 1; S. 59 (1938)

25. HALLMANN, L.
Bakteriologie und Serologie. S. 50 (Stuttgart, 1950)
26. MÜLLER, R.
Lehrbuch der Hygiene, II: Medizinische Mikrobiologie
S. 165 (München-Berlin, 1944)
27. SCHMIDT, H.
Fortschritte der Serologie, Lief. 5, S. 227 (1951)
28. LANCEFIELD, R. und R. HARE
J. Exp. Med. 61; S. 345 (1935)
29. SMITH, F.R. NIVEN, F.C. und J.M. SHERMANN
J. Bakt. 35 ; S. 425 (1938)
30. SCHMIDT, H.
Fortschritte der Serologie, Lief. 13, S. 770 und
772 (1953)
31. WAALER, E.
Act. Path. Scand. 17; 172 (1940)
32. ROSE, H.M., RAGAN, C., PEARCE, E. und M.O. LIPMAN.
Proc. Soc. Exp. Biol. a. Med. 68; S. 1 (1948)

Lebenslauf:

Geboren am 23. Mai 1931 als Tochter des Bundesbahnamtsrates Josef Schießl und seiner Frau Erika, geb. Funk, zu Augsburg.

1938-1942 Volksschule vor dem Roten Tor zu Augsburg.

1942-1943 Maria-Theresia-Oberschule für Mädchen, Augsburg.

1943 Evakuierung nach Allenstein/Ostpr.; Luise-Oberschule für Mädchen, Allenstein.

1944 Übersiedlung nach Danzig.

1944-1945 Gudrun-Oberschule für Mädchen, Danzig-Langfuhr.

Jan. 1945 Flucht nach Erfurt; Mädchenoberschule.

Bei Kriegsende Jngolstadt/Donau.

1945-1947 Realgymnasium für Mädchen am Kloster Gnadensthal in Jngolstadt.

1947-1950 Oberrealschule für Mädchen am Englischen Institut zu Augsburg.

Juli 1950 Matura.

Wi.Se. 1950/51 Studienbeginn.

1950-1952 Ludwig-Maximilian-Univ. München.

1952 Johann-Wolfgang-Goethe-Univ. Frankfurt/M.

1952-1953 Philipps-Univ. Marburg/Lahn. Physikum.

Seit Wi.Se. 1953/54 Joh.-Wolfgang-Goethe-Univ. Ffm.

Mit der vorliegenden Arbeit, deren experimenteller Teil im Infektionslabor der I. Med. Univ.-Klinik ausgeführt wurde, beschäftige ich mich seit Dezember 1953.

Für die wertvollen Anregungen und Hinweise möchte ich Herrn Dr. P. Christ ganz besonders danken.

